EINFLUSS VON PHARMAKA AUF MESENCHYMALE STOFFWECHSELPROZESSE FETALER TIBIAKULTUREN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER MINERALISATION

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

JOHANN KRISINGER

aus

HÜRTH-KNAPSACK

BONN 1985

EINFLUSS VON PHARMAKA AUF MESENCHYMALE STOFFWECHSELPROZESSE FETALER TIBIAKULTUREN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER MINERALISATION

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem. -Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

JOHANN KRISINGER

aus

HÜRTH-KNAPSACK

BONN 1985

Die vorliegende Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Karzel angefertigt.

1. Referent: Prof. Dr. K. Karzel

2. Referent: Prof. Dr. E. Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 19.9.1985

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
komm. Direktor: Prof. Dr. K. Karzel

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Meiner Familie in Dankbarkeit

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546507_0006

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite:
1.	EINLEITUNG	8
1.1.	Binde- und Stützgewebe	8
1.1.1.	Entwicklung, Aufbau und Funktion	8
1.1.2.	Knorpelgewebe	10
1.1.3.	Knochengewbe	11
1.1.4.	Ossifikation	13
1.1.4.1.	Interzellularsubstanzen des Knochengewebes	15
1.1.4.2.	Mechanismus der Calcifizierung	21
1.1.4.2.1.	Sättigungstheorie	22
1.1.4.2.2.	Nukleationstheorie	23
1.1.4.2.3.	Inhibitionstheorie	25
1.1.5.	Mechanismus der Knochenresorption	27
1.1.6.	Physiologische Regulation der Mineralisation und Knochenresorption	31
1.1.7.	Pathologische Veränderungen der Mineralisation und Knochenresorption	33
1.1.7.1.	Osteodystrophia deformans Paget	33
1.1.7.2.	Osteoporose	34
1.1.7.3.	Myositis ossificans progessiva	35
2.	PROBLEMSTELLUNG	37
3.	MATERIAL UND METHODEN	
3.1.	Versuchsobjekt	40
3.1.1.	Zucht der Mäuse und Bestimmung der Tragzeit	40
3.1.2.	Präparation der Tibiae	40
3.2.	Versuchsanordnung	41
3.2.1.	Inkubation	41
3.2.2.	Begasung	44
3.3.	Nährmedium	45
3.3.1.	Zusammensetzung	45
3.3.2.	Mediumwechsel	47

3.4.	Analytische Verfahren	Seite: 47
3.4.1.	Wachstum der Explantate	47
3.4.2.	Kombinierte Bestimmung von Protein, Hydroxyprolin, DNA und Uronsäure	48
3.4.3.	Calciumbestimmung	56
3.4.3.1.	Ermittlung des Calciumgehaltes der Explantate	56
3.4.3.2.	Bestimmung des ionisierten Calciums im Nährmedium	57
3.5.	Statistische Auswertung	59
3.6.	Prüfstoffe	60
4.	VERSUCHSERGEBNISSE	
4.1.	Entwicklung der Tibiae in vivo	61
4.2.	Mineralisation in vitro	63
4.2.1.	Einfluß von Natrium-ß-glycerophosphat	64
4.3.	Verhalten der Explantate unter in vitro-Bedingungen	68
4.4.	Einfluß einer modifizierten Calcium-konzentration auf die Tibiae	71
4.5.	Pharmakaeinflüsse auf die Tibiakulturen	
4.5.1.	Natriumfluorid	77
4.5.2.	Mellitsäure	83
4.5.2.1.	Einfluß von Mellitsäure auf das ionisierte Calcium im Nährmedium	88
4.5.3.	1-Hydroxyethyliden-1,1-bisphosphonat (Etidronsäure)	91
4.5.4.	3-Amino-1-hydroxypropyliden-1,1-bis-phosphonat	96
4.5.5.	Propyliden-2,2-bisphosphonat	100
4.6.	Einfluß der Bisphosphonate auf das ionisierte Calcium im Nährmedium	104

		Seite:
5.	DISKUSSION	
5.1.	Mineralisation in vitro (Einfluß von Na-ß-glycerophosphat auf kultivierte Tibiae)	107
5.2.	Verhalten der Explantate unter in vitro-Bedingungen	111
5.3.	Einfluß einer modifizierten Calciumkonzentration auf die Tibiakulturen	113
5.4.	Einfluß von Pharmaka auf die Tibiakulturen	
5.4.1.	Natriumfluorid	114
5.4.2.	Mellitsäure	118
5.4.3.	Bisphosphonate	120
5.4.3.1.	1-Hydroxyethyliden-1,1-bisphosphonat (Etidronsäure)	122
5.4.3.2.	3-Amino-1-hydroxypropyliden-1,1-bisphosphonat	127
5.4.3.3.	Propyliden-2,2-bisphosphonat	130
6.	ZUSAMMENFASSUNG	134
7.	LITERATURVERZEICHNIS	137

Häufig verwendete Abkürzungen:

AHPrBP	3-Amino-1-hydroxypropyliden-1,1-bisphosphonat
Ca	Calcium
CT	Calcitonin
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
F	Fläche
GAG	Glykosaminoglykan
HEBP	1-Hydroxyethyliden-1,1-bisphosphonat
HP	Hydroxyprolin
$1.25(OH)_2$-D_3	1,25-Dihydroxycholecalciferol
P	Protein
PGE_2	Prostaglandin E_2
PrBP	Propyliden-2,2-bisphosphonat
PTH	Parathormon

1. Einleitung

1.1. Binde- und Stützgewebe

1.1.1. Entwicklung, Aufbau und Funktion

Das Bindegewebe ist eine besonders differenzierte Gewebsform, die die Organe mit der Nachbarschaft verbindet und deren innere und äußere Form festigt. Als besonderes Merkmal weist diese Art Gewebe einen relativ großen Anteil an Interzellularsubstanz auf, welche entscheidend die Eigenschaften des Gewebes bestimmt und zu Erscheinungsformen so unterschiedlicher Strukturen wie der Kornea oder des Dentins führen. Ihren gemeinsamen Ursprung haben alle Formen des Bindegewebes im Mesenchym. Bereits in dieser embryonalen Vorstufe zeigt das Gewebe die typischen großen Interzellularräume, während die Mesenchymzellen selbst nur durch Zellausläufer miteinander verbunden sind.
Das Mesenchym differenziert sich hauptsächlich in drei Richtungen;

a) es bilden sich die faser- und hartsubstanzhaltigen Stützgewebe und das Fettgewebe,
b) es ist verantwortlich für die Bildung der Blutzellen und des Immunsystems,
c) aus dem Mesenchym entstehen glatte Muskelzellen und die endokrinen Zwischenzellen der Keimdrüsen.

Die bei der Differenzierung entstehenden, verschiedenen Formen des Bindegewebes unterscheiden sich vor allem in der Zusammensetzung der Interzellularsubstanzen. Grundsätzlich unterscheidet man hierbei zwei Typen:

1. Die amorphe Grundsubstanz (Proteoglykane)
2. Geformte Grundsubstanz (Bindegewebsfasern)

Bei den Proteoglykanen handelt es sich um zusammengesetzte Verbindungen aus einem Polysaccharidanteil und einem Proteinanteil. Der Polysaccharidanteil wird aus Aminozuckern und D-Glukuronsäure bzw. D-Galaktose aufgebaut. Man bezeichnet diesen Anteil auch als Glykosaminoglykan (früher auch als Mukopolysaccharid). Die Fasern des Bindegewebes sind verschiedene Proteine, welche nach ihren spezifischen Eigenschaften in 3 Gruppen eingeteilt werden: kollagene, retikuline und schließlich elastische Fasern. Bei der am höchsten ausdifferenzierten Form des Stützgewebes, dem Knochengewebe, kommt zu den beiden Grundsubstanzen der Einbau von anorganischen Bestandteilen (Hartsubstanz) hinzu. In erster Linie handelt es sich hierbei um Hydroxylapatit $3Ca_3(PO_4)_2 \cdot Ca(OH)_2$, welcher beim Erwachsenen mit ca. 65% die Hauptmasse des Knochens darstellt.
Auf die Interzellularsubstanzen soll detaillierter im Kapitel 1.1.4.1. eigegangen werden.
In die Grundsubstanzen eingebettet liegen die Bindegewebszellen. Diese werden in mobile (freie) und fixe (ortsansässige) Zellen gegliedert. Zu den mobilen Zellen gehören vor allem Zellen des Immunsystems wie Histiozyten, Monozyten, Plasmazellen, Lymphozyten, Granulozyten und Mastzellen. Die fixen Bindegewebszellen sind für die Bildung der Interzellularsubstanzen verantwortlich und haben ihren Ursprung in der wenig ausdifferenzierten Form der Fibroblasten, welche je nach Gewebstyp zu Chondroblasten (Knorpelgewebe), Osteoblasten (Knochengewebe) oder Odontoblasten (Dentin) heranreifen können.
In der vorliegenden Arbeit dienten als Versuchsobjekt Kulturen muriner, fetaler Tibiaanlagen, die am 19. Tag der Tragzeit entnommen wurden. In diesem Entwicklungsstadium handelt es sich um eine Knochenanlage mit noch weitgehend knorpeliger Struktur, welche jedoch schon eine deutliche Mineralisation, Vaskularisierung und eine vorgebildete Markhöhle aufweist. Daher soll im Folgenden näher auf die Entwicklung und den Aufbau des Stützgewebes eingegangen werden.

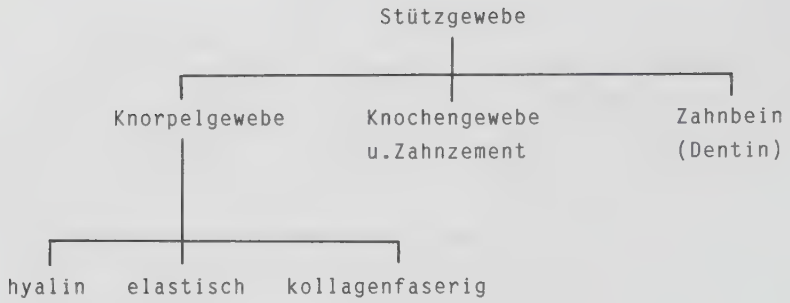


Abb.1: Das Stützgewebe modifiziert nach Thews et al. (1980)

Zu den Stützgeweben zählen Knorpel- und Knochengewebe. Der Vollständigkeit halber sei noch das Chordagewebe genannt, das beim Menschen nur in der Embryonalzeit existiert und als Achsenorgan die Chorda dorsalis bildet. Knorpel- und Knochengewebe enthalten kollagene Fasern und besitzen damit die Zugfestigkeit von Bindegewebsstrukturen. Durch eine spezielle Ausbildung der Grundsubstanz beim Knorpel und durch Einlagerung von anorganischen Salzen beim Knochen werden die mechanischen Eigenschaften der Gewebe modifiziert.

1.1.2. Knorpelgewebe

Bei der Entwicklung des Knorpels differenzieren Fibroblasten zu Chondroblasten, welche durch die Synthese von Kollagen und Proteoglykanen zum interstitiellen Wachstum führen. Umgeben ist das Gewebe von gefäßführendem Perichondrium, während der Knorpel selbst nicht vaskularisiert ist und durch Diffusionsprozesse ernährt werden muß. Im endgültigen Reifezustand bezeichnet man die Knorpelzellen als Chondrozyten. Diese liegen als kleine Gruppen, in der sog. Knorpelhöhle vor und werden in dieser Anordnung als Chondrone bezeichnet.

Morphologisch unterscheidet man zwischen hyalinem, elastischem und Faserknorpel.
Der am weitesten verbreitete hyaline Knorpel besteht aus kollagenen Fasern, die in Grundsubstanz eingebetet sind und von dieser maskiert werden. Diese Knorpelart findet sich in embryonalem Skelett, Luftröhre, Bronchien und zeichnet sich durch eine besondere Druckelastizität aus. Der Mineralanteil des hyalinen Knorpels beträgt nur etwa 10% , der Anteil der Chondrozyten am Gewebevolumen nur etwa 0,01 - 0,1%. Dem hyalinen Knorpel ähnlich ist der fetale Knorpel, der als Vorläufer des sekundär ossifizierenden Skeletts dient und im Gegensatz zu den übrigen Knorpelarten vaskularisiert ist.
Beim elastischen Knorpel kommen zu den Bestandteilen des hyalinen nicht maskierte, elastische Fasernetze hinzu, welche die Chondrone umgeben. Er erfährt keine Kalkeinlagerungen und verknöchert nicht. Das morphologische Bild des Faserknorpels wird vor allem durch den hohen Anteil an Kollagenfasern bestimmt. Diese sind nicht maskiert und mauern die kleinen Chondrone, die nur noch einen Saum von Knorpelgrundsubstanz aufweisen, in sich ein. Der elastische Knorpel ist weitaus weniger verbreitet als der hyaline und ist z.B. am Aufbau der Ohrmuschel und des Gehörgangs beteiligt, daneben bildet er die Zwischenwirbelscheiben und die Gelenkscheiben (Menisci und Disci).

1.1.3. Knochengewebe

Der ausdifferenzierte Knochen ist gemeinsam mit dem Zahnbein nach dem Zahnschmelz die härteste Substanz des Organismus. Die große mechanische Widerstandsfähigkeit resultiert aus dem hohen Anteil an Hydroxylapatit und den kollagenen Fasern. Beim Aufbau der Knochensubstanz kommt es zur vollkommenen Durchdringung der organischen mit den anorganischen Bestandteilen, so daß eine Trennung voneinander erst im mikroskopischen Bereich möglich ist. Auf

Grund der unterschiedlichen Anordnung der Kollagenfibrillen unterscheidet man Geflecht- und Lamellenknochen voneinander. Beim Geflechtknochen existiert keine besonders orientierte Ausrichtung der Fibrillen, während dies beim Lamellenknochen der Fall ist. Der Geflechtknochen dient als Vorstufe des Lamellenknochens und kommt ansonsten beim Menschen nur während der Bruchheilung oder z.B. an den Ansatzstellen von Bändern und Sehnen vor.
Die Ausrichtung der Kollagenfaserbündel mit entsprechender Parallelanordnung der Apatitkristalle bestimmt den Aufbau des Lamellenknochens. Typische Beispiele für Lamellenknochen sind die großen Röhrenknochen wie Femur, Tibia und Humerus. Bei dieser Art des Knochens wird zunächst eine vorgebildete Form aus Knorpel aufgebaut, welche anschließend sekundär verknöchert (sekundäre oder chondrale Ossifikation). Dem gegenüber steht die direkte (primäre oder desmale) Ossifikation der Deckknochen wie z.B. die Knochen der Schädelkalotte. Der bei der sekundären Ossifikation entstandene Geflechtknochen unterliegt bei weiterer Entwicklung Umbauprozessen, die ausschließlich zur Bildung des stabileren Lamellenknochens führen. Beim Lamellenknochen bestimmen die einsprossenden Gefäße den Verlauf der Lamellen und bilden mit diesen das sogenannte Osteon (oder Haverssches System). Im Zentrum eines Osteons befindet sich somit das Gefäß (Haverssches Gefäß) mit perivaskulärem Bindegewebe und nach außen hin schließen sich zirkuläre Lamellen an. Die Osteoblasten mauern sich selbst beim Aufbau der Lamellen in die Grundsubstanz ein und werden nun Osteozyten genannt. Sie stehen untereinander durch dünne Fortsätze in Verbindung. Zu den in der Längsachse des Knochens verlaufenden Haversschen Gefäßen kommen die Volkmannschen Gefäße, welche die Querverbindung zu den Gefäßen der Knochenhaut (Periost) darstellen. Den Abschluß des Knochengewebes nach nnen bzw. nach ußen stellt die innere bzw. äußere Generallamelle dar. Im Innern der Röhrenknochen bildet sich schon früh eine primäre Markhöhle, wobei der Raum zwischen den Knochenbälkchen mit Mesenchym angefüllt ist und noch keine Hämatopoese erfolgt. Sobald hier die Blutbildung stattfindet spricht man von der sekundären Markhöhle, welche jedoch bei vielen Röhrenknochen im ausgereiften

Skelett mit Fettgewebe angefüllt wird und dann nicht mehr zur Blutzellbildung beiträgt.

1.1.4. Die Ossifikation

Unter dem Begriff der Ossifikation versteht man die Bildung von Knochengewebe, d.h. sowohl Ablagerung der organischen Matrixbestandteile als auch Einlagerung von Mineral. Hiervon zu unterscheiden ist die Mineralisation, worunter man lediglich die Einlagerung von Mineralien versteht. Schließlich meint der Begriff Verkalkung speziell die Einlagerung von Calciumsalzen in das Gewebe.
Wie bereits oben erwähnt unterscheidet man eine direkte (auch intramembranöse Ossifikation genannt) und eine indirekte enchondrale Ossifikation. Bei der direkten Ossifikation differenzieren die Fibroblasten des Mesenchyms zu Osteoblasten und sondern Grundsubstanz (Osteoid) ab. Anschließend bilden die Osteoblasten Tropokollagen, das im Osteoid zu Kollagenfibrillen aggregiert. Durch Anreicherung von Calcium- und Phosphationen kommt es zur Ausfällung von amorphem Calciumphosphat, welches durch Umlagerung in die Form des Hydroxylapatits übergeht. Hierbei kommt es zu einer Beziehung der Querstreifen der Kollagenfasern und der Anlagerung der Kristalle. Der desmalen Ossifikation gegenüber steht die chondrale Ossifikation, wobei diese wiederum in die enchondrale und in die perichondrale gegliedert werden muß. Im Zuge der perichondralen Ossifikation der Röhrenknochen-Diaphysen bildet sich eine Knochenmanschette aus dem Perichondrium, der dem knorpeligen Modell aufliegenden Bindegewebsschicht. Der Einteilung nach ist dieser Vorgang wie die Entstehung der Bindegewebsknochen eine desmale Ossifikation. Des weiteren spielen sich im Knorpel der Diaphyse zusätzliche Verknöcherungsvorgänge ab. Bei dieser enchondralen Ossifikation sprossen zunächst Gefäße in den Knorpel ein und durch Differenzierung der Mesenchymzellen entstandene Chondroklasten bauen die Knorpelsubstanz ab. Bei diesem Vorgang

bilden sich die sogenannten Lakunen. Diese Hohlräume werden dann von Osteoblasten, ähnlich wie bei der direkten Ossifikation, mit Osteoid, Kollagen und anorganischen Substanzen ausgekleidet. Durch die perichondrale und die enchondrale Umwandlung der Diaphyse in Knochengewebe kommt es schließlich zu den Knochenköpfen hin zu einer Grenzzone zwischen knöcherner Diaphyse und knorpeligen Epiphysen. Diese Grenzschichten sind von besonderer Bedeutung und werden in vier Zonen von den Epiphysen zur Diaphyse hin eingeteilt:

1. Zone des Säulenknorpels mit proliferierenden Knorpelzellen
2. Zone des Blasenknorpels mit hypertrophierenden Knorpelzellen
3. Eröffnungszone mit Knorpelabbau und Kapillarisierung
4. Knochenanbauzone mit Knochenbälkchen und mineralisierter Grundsubstanz

Erst im weiteren Verlauf der Verknöcherung werden die Epiphysen in den Umbauprozess mit einbezogen. Hierbei beginnt dieser Prozess wiederum durch das Einsprossen von Gefäßen und läuft dann als enchondrale Ossifikation von verschiedenen Ossifikationspunkten aus ab. Es bleibt letzlich nur noch der Gelenkknorpel, als ein knorpeliger Überzug über den Epiphysenköpfen bzw. zur Diaphyse hin die sogenannte Epiphysenfuge als unverknöcherte Region zurück. Die Epiphysenfuge (auch Wachstumsfuge genannt) stellt den Ort des Längenwachstums der Röhrenknochen dar. Hier kommt es gleichzeitig zum An- bzw. Abbau von Knorpelsubstanz mit anschließender sekundärer Ossifizierung. Die Epiphysenfuge schließt sich durch vollständige Verknöcherung nach Abschluß des Längenwachstums. Dieser Vorgang kann mit zur Altersbestimmung des Skeletts herangezogen werden. Zum Dickenwachstum kommt es durch Bildung neuer aktiver Osteoblasten aus der Kambiumschicht des Periosts, welche von der Außenseite ein apositionelles Wachstum ermöglichen. Vom Markraum her wird parallel hierzu Knochensubstanz von Osteoklasten abgebaut, wobei sich die Markhöhle vergrößert und ein übermäßiges Verdicken der Knochenmanschette verhindert wird. Zu diesen Anbauvorgängen kommen während der

gesamten Lebensdauer des Organismus Knochenumbauvorgänge. Dieser Prozess stellt wiederum ein Zusammenwirken von abbauenden Osteoklasten und anbauenden Osteoblasten dar. Er gestattet es dem Knochen, sich den erforderlichen statischen Verhältnissen anzupassen und an der Aufrechterhaltung der Homöostase (Calcium- und Phosphatspiegel) zu beteiligen.

1.1.4.1. Interzellularsubstanzen des Knochengewebes

Um die genaueren Vorgänge bei der Mineralisation beschreiben zu können, muß die Grundsubstanz in ihrer Gesamtheit bestehend aus Kollagenfasern, Proteoglykanen und Mineralien betrachtet werden.

Kollagen

Beim Kollagen handelt es sich um ein Skleroprotein, dessen besondere Eigenschaften Quartärstruktur begründet sind. Sie besteht aus 3 helikalen Peptidketten, welche zu einer Superhelix verdrillt sind. Eine weitere Besonderheit des Kollagens besteht in seinem hohen Gehalt (ca. 13%, Buddecke 1977) an Hydroxyprolin, einer nahezu kollagenspezifischen Aminosäure. Das unlösliche Molekül wird in einer löslichen Vorstufe, dem Prokollagen, von den Bindegewebszellen sezerniert. Dieses Prokollagen trägt an den jeweiligen Enden ein sogenanntes C-terminales bzw. N-terminales Propeptid. Nach Ausschleusung in den Extrazellulärraum werden die Propeptide durch spezifische Peptidasen abgespalten, und es bildet sich das eigentliche Kollagenmolekül. Hierauf verbinden sich die Kollagenmoleküle duch Seit-zu-Seit- und End-zu-End-Anlagerung zu Fibrillen. Kovalente Bindungen zu den Kollagenmolekülen verstärken diese zusätzlich und führen durch Vernetzung der Moleküle zu unlöslichen Kollagenfibrillen.

Die Primärstruktur und die Biosynthese des Kollagens sind schematisch in Abb. 2 dargestellt. Aus dem Schema ist ersichtlich, daß zunächst in das Prokollagenmolekül bei der Biosynthese nicht das Hydroxyprolin eingebaut wird, sondern seine Vorstufe das Prolin, welche erst anschließend in Gegenwart von Sauerstoff und Ascorbinsäure hydroxyliert wird. Zu dieser Hydroxylierungsreaktion ist weiterhin die Gegenwart von zweiwertigem Eisen und α-Ketoglutarat erforderlich. Beim Fehlen eines dieser Co-Faktoren kann sich nicht die charakteristische Tripelhelix des Kollagens bilden und das Protein kann nicht seine eigentliche Funktion als Strukturprotein übernehmen. Nach dieser Hydroxylierungsreaktion wird ein Teil der Hydroxylysinreste des Prokollagens mit Galaktose verknüpft, worauf diese wiederum mit Glukose eine Glykosidbindung eingeht. Der prosthetische Kohlenhydratanteil macht etwa 2 % des Kollagens aus.

Kollagentypen

Die Primärprodukte der Kollagensynthese, die α-Ketten, existieren in geringfügigen Variationen und sind am Aufbau unterschiedlicher Kollagentypen beteiligt. Man unterteilt in fünf verschiedene Kettentypen: α_1I, α_1II, α_1III, α_1IV und α_2. Jeder Kettentyp hat ein Molekulargewicht von ca. 100.000. Durch Kombination drei dieser Ketten entstehen die verschiedenen Kollagentypen. Das Typ-I-Kollagen stellt den Hauptfaserbestandteil der Knochen dar und besteht aus zwei α_1I- und einer α_2-Kette. Das Knorpelgewebe enthält hauptsächlich Typ-II-Kollagen, bestehend aus 3 α_1II-Ketten. Neben diesen beiden Typen existieren noch Kollagene Typ-III-V, welche in den übrigen Geweben vorkommen und aus drei Ketten der α_1-Gruppe aufgebaut sind.

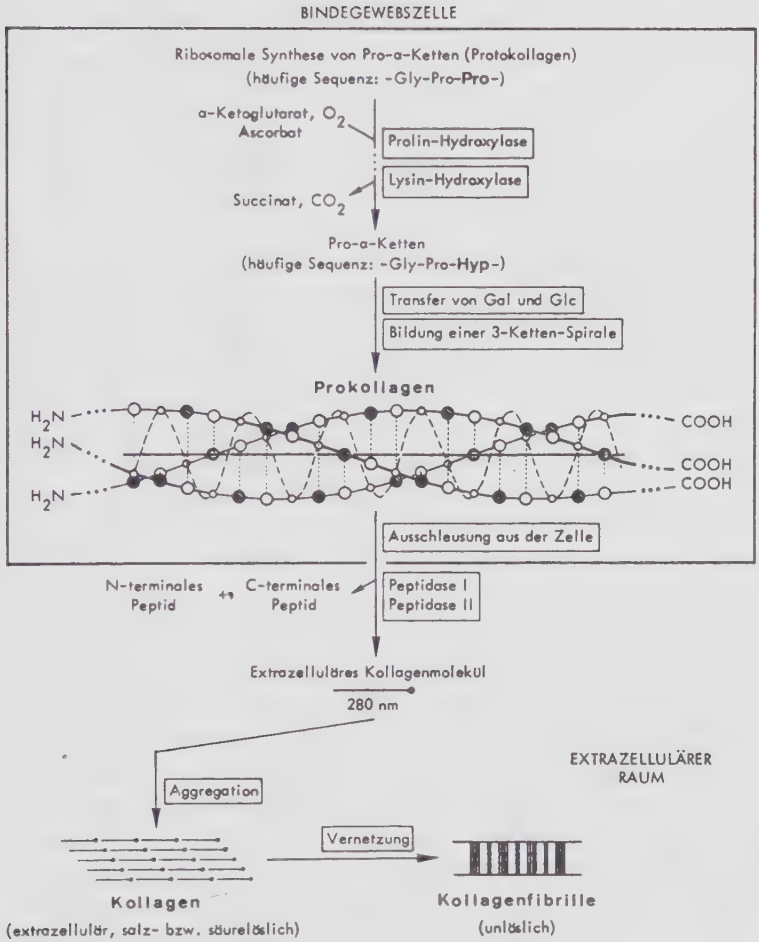


Abb. 2: Schematische Darstellung der Kollagenbiosynthese nach Buddecke (1984)

Proteoglykane

Neben den kollagenen Fasern und den Mineralien enthält die extrazelluläre Matrix des Knochens weitere organische Bestandteile, die zusammengesetzte Verbindungen aus einem Proteinanteil und einem Polysaccharidanteil darstellen, wobei der Polysaccharidanteil überwiegt. Im ausdifferenzierten, ausgewachsenen Knochengewebe ist der Gehalt an Proteoglykanen sehr niedrig, während der Gelenkknorpel und die knorpeligen Vorstufen der Knochen einen hohen Gehalt an Proteoglykanen aufweisen.
Beim Polysaccharidanteil der Makromoleküle handelt es sich um anionische Linearpolymere, bestehend aus N-acetylierten oder sulfatierten Aminozuckern und Uronsäuren oder Galaktose. Diese Bausteine können unverzweigte Ketten von 100 - 1000 Disaccharideinheiten bilden und werden ihren Eigenschaften nach Mucopolysaccharide, oder dem Aufbau nach Glykosaminoglykane genannt. Auf Grund unterschiedlicher Monosaccharidkomponenten, des Sulfatgehalts bzw. der glykosidischen Bindung existieren acht verschiedene Glykosaminoglykane. Die einzelnen Bindegewebe weisen gewebs- und altersspezifische Verteilungsmuster der Glykosaminoglykane auf, dabei sind Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat und Keratansulfat die im Knorpel vorkommenden. Über die geringen Mengen an Glykosaminoglykanen des Knochens liegen bisher nur spärliche Befunde vor. Diese deuten auf ein Vorkommen von Chondroitinsulfaten und Dermatansulfat hin. Der zweite Bestandteil eines Proteoglykans ist ein spezifisches Protein, das sog. Core-Protein, an das die Glykosaminoglykane kovalent gebunden sind. An einem Coreprotein können Glykosaminoglykane in unterschiedlicher Anzahl gebunden sein (bis über 100). Diese Makromoleküle haben ein Molekulargewicht von durchschnittlich einer Million. Im Extrazellulärraum binden sich die Proteoglykane über ein Linkprotein an eine Hyaluronsäurekette, wodurch Superaggregate von außerordentlicher Größe entstehen. Die Hyaluronsäure selbst ist ebenfalls ein Glykosaminoglykan, zusammengesetzt aus N-Acetylglukosamin und Glukuronsäure. In der Matrix des Knorpels kommt es

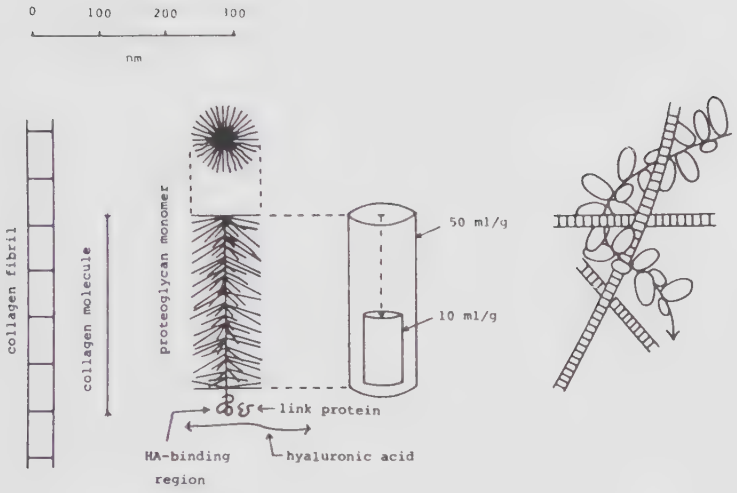


Abb. 3: Schematische Darstellung der Proteoglykane nach Hascall und Lowther (1982)
Dargestellt ist ein typisches Proteoglykan aus Knorpelgewebe mit etwa 100 Chondroitinsulfat-Seitenketten am Coreprotein. Als ausgedehnte Struktur würde das Proteoglykan ein Volumen von 50 ml/g einnehmen. Im Gewebe ist die Konzentration jedoch so hoch, daß nur etwa ein Volumen von 10 ml/g entsteht. (kleiner bzw. großer Zylinder) Im linken Teil der Abbildung ist ein einzelnes Kollagenmolekül und eine dünne Kollagenfaser zum Vergleich im selben Maßstab gezeichnet. Im rechten Teil der Abblidung ist ein Ausschnitt aus der Hyaluronsäurekette mit den angehefteten Proteoglykanen und der Verflechtung mit den Kollagenfasern dargestellt.

zur intensiven Verflechtung der Proteoglykane mit den Knorpelfasern. Gemeinsam stellem sie einen Verbund dar, der seine mechanische Festigkeit und seinen strukturellen Halt den Fasern, seine Druckelastizität und sein enormes Wasserbindungsvermögen den Proteoglykanen verdankt. Bei der Biosynthese wird zunächst das Core-Protein gebildet, an das dann Monosaccharidbausteine gekoppelt werden, die im weiteren Verlauf duch Addition der entsprechenden Monosaccharide zu den polymeren GAG heranwachsen.

Mineralien

Das Knochenmineral des erwachsenen Menschen setzt sich zusammen aus: 85% Calciumphosphat, 10% Calciumcarbonat, 1,5% Magnesiumphosphat, 0,3% Calciumfluorid, 0,2% Calciumchlorid, etwa 2% Alkalisalzen und Spurenelementen wie Strontium, Radium, Blei und Zink (Leonhardt 1974). Dabei liegt der Hauptbestandteil des Knochenminerals, das Calciumphosphat, teils als amorphes Phosphat $Ca_3(PO_4)_2$ und teils als kristalliner Hydroxylapatit $3Ca_3(PO_4)_2 \cdot Ca(OH)_2$ vor. Durch die relativ geringe Größe der natürlichen Apatitkristalle kommt eine große Grenzfläche des Knochenminerals zustande. Diese Grenzfläche ist physikalisch-chemisch nicht einheitlich, sondern gliedert sich von Innen nach Außen in 3 Zonen:

1. Kristallinneres
2. Kristalloberfläche im eigentlichen Sinne
3. Hydratationsschale

Dieser zonalen Gliederung der Grenzschicht kommt eine Bedeutung zu, wenn man verschiedene Umbauvorgänge, Adsorptionsphänomene und Einlagerungsprozesse am Knochen betrachtet. Das molare Verhältnis von Calcium zu Phosphat ist variabel und liegt zwischen 1,37 und 1,71. Die Abweichung vom theoretischen Verhältnis (1,67) des Hydroxylapatits ist begründet durch unterschiedliche Mengen anderer Ionen, die in das Kristallgitter eingebaut werden können.

Z.B. kann Calcium durch Natrium, Strontium und Blei substituiert werden. Als weitere Anionen können Fluorid und Chlorid in das Kristallgitter eingebaut werden (Bachra 1970). Ein großer Anteil des Carbonates im Mineral ist wahrscheinlich nur adsorptiv an der Mineraloberfläche gebunden und nicht direkt am Aufbau der Kristallgitter beteiligt. Das Knochenmineral ist als solches also ein Gebilde, welches keine ideale Kristallstruktur besitzt, dadurch aber zum einen schwer löslich genug ist, um dem Stützgewebe Stabilität zu verleihen und zum anderen reaktiv genug bleibt, um an Stoffwechselprozessen mitzuwirken. Zu diesen Stoffwechselprozessen zählen Knochenumbau,-heilung und -resorption, welche u.a. für das Wachstum des Organismus und für den Elektrolythaushalt fundamentale Bedeutung haben. Eine besondere Rolle kommt auch dem amorphen Calciumphosphat zu, welches einen Anteil von ca. 40% des Knochenminerals beim Erwachsenen hat und wahrscheinlich die erste Form des Calciumphosphats bei der Verknöcherung darstellt. Es ist eine Umwandlung des amorphen Phosphates in die kristalline Struktur möglich, die durch eine Reihe von Faktoren beeinflußt wird. Beispielsweise hemmen Pyrophosphat, Bisphosphonate, ATP, und Magnesium die Bildung des kristallinen Apatits aus amorphem Phosphat. Mit zunehmendem Alter vermindert sich der Anteil des amorphen Phosphates zugunsten der kristallinen Form.

1.1.4.2. Mechanismus der Calcifizierung

Das Löslichkeitsprodukt des Calciumphosphates im Ultrafiltrat des Blutes liegt oberhalb der Löslichkeit des Hydroxylapatits. Trotzdem fällt kein Apatit aus der übersättigten Lösung aus, da zur Bildung des Kristalls eine Energiebarriere überwunden werden muß. Bezüglich des normalen Calciumphosphats ist das Ultrafiltrat nicht gesättigt. Kommt es jedoch durch bestimmte Prozesse, die im folgenden erörtert werden sollen, zur Präzipitation von amorphem

Calciumphosphat, entsteht über nicht genau bekannte Zwischenstufen kristalliner Hydroxylapatit. Wenn einmal Apatitkristalle als Kristallisationskeime vorhanden sind, ist die oben erwähnte Energiebarierre der De-Novo-Synthese nicht mehr vorhanden und es kommt spontan zum Kristallwachstum.
Der molekulare Mechanismus der Calcifizierung ist bis heute unklar. Bei der Aufstellung einer Theorie über den molekularen Ablauf bei der Einlagerung des schwerlöslichen Apatits in das Stützgewebe müssen eine Reihe von Fragen beantwortet werden. Durch die heute existierenden Überlegungen ist dies nicht hinreichend möglich. Hier seien nur zwei Kernfragen erwähnt: Durch welche Prozesse ist der Organismus in der Lage, so große Mengen schwerlöslicher Mineralien in bestimmten Gebieten einzulagern? Warum mineralisieren nicht auch andere Bindegewebe, wie Bänder, Sehnen und Haut, deren organische Strukturelemente den verknöchernden sehr ähnlich sind ?
Heute werden drei verschiedenen Theorien der Calcifizierung diskutiert, wobei jede für sich nicht die gesamten Phänomene der Mineralisation erklären kann. Wahrscheinlich laufen verschiedene Mechanismen parallel ab, bzw. hängt der Ablauf von der Art des Gewebes ab. So bestehen z.B. Unterschiede in Entstehung und Orientierung der Kristalle im Geflechtknochen und Lamellenknochen.

1.1.4.2.1. Sättigungstheorie

Diese älteste Theorie basiert hauptsächlich auf dem Vorkommen der alkalischen Phosphatase im Knochen und der eindeutigen Beziehung des Enzyms zur metabolischen Aktivität des Skelettsystems. Der normale Gehalt an Calcium und Phosphat ist nicht hoch genug, um eine spontane Ausfällung des Minerals herbeizuführen. Die alkalische Phosphatase soll durch lokale Spaltung organischer Phosphatverbindungen das Löslichkeitsprodukt ausreichend erhöhen, so daß eine Präzipitation von amorphem Calciumphosphat möglich ist. Problematisch ist der Nachweis einer solchen lokalen Erhöhung der Phosphatkonzentration. Mit bisherigen Methoden konnte

ein solcher Konzentrationsanstieg im mineralisierenden Gewebe nicht gezeigt werden. Jedoch bleibt es unklar, ob z.B. in den Matrixvesikeln, welche im engen Zusammenhang mit den Mineralisationsprozessen gesehen werden, eine solche "Mikroumgebung" geschaffen wird. Im Innern dieser membranösen Strukturen konnte eine hohe Konzentration an alkalischer Phosphatase nachgewiesen werden, während sich allerdings die Erhöhung des Calcium-Phosphat-Produkts den derzeitigen Bestimmungsmethoden entzieht. Neben dem fehlenden Nachweis für diese Vorgänge bleibt auch die Frage unbeantwortet, warum andere Gewebe, in denen ebenfalls reichlich alkalische Phosphatase vorkommt, nicht mineralisieren. Neben der Erhöhung der Phosphatkonzentration gibt es auch Hinweise auf einen möglichen lokalen Anstieg der Calciumkonzentration durch ein sogenanntes "calciumbindendes Protein" und Glykoproteine.

1.1.4.2.2. Nukleationstheorie

Wie bereits eingangs erwähnt, reicht die Übersättigung einer Lösung noch nicht aus, um Präzipitate zu bilden. Der erste Schritt zur Bildung eines Niederschlags ist die Ansammlung einer ausreichenden Anzahl von Teilchen zu einem sogenannten "Cluster". Diesen Vorgang bezeichnet man als Nukleation. Die Tendenz der Moleküle, Cluster zu bilden ist beispielsweise konzentrations- und temperaturabhängig. Existieren noch keine Kristalle, und handelt es sich um eine absolut homogene Lösung aus den zu betrachtenden Ionen, so liegt eine homogene Nukleation vor. In biologischen Systemen findet man natürlich nie derart reine Lösungen, sodaß es sich hierbei immer um heterogene Nukleationen handelt. D.h., die vorhandenen Fremdionen und biologischen Strukturen, wie etwa Membranen oder Kollagenfasern, können den Vorgang der Nukleation beeinflussen. Normalerweise ist die zu überwindende Energiebarriere bei der heterogenen Nukleation kleiner als bei der homogenen. Liegt bereits die zu bildende kristalline Struktur als feste Phase vor, spricht man von einer sekundären

Nukleation, welche thermodynamisch noch leichter möglich ist.

Die Relevanz dieser Vorgänge wird beispielsweise deutlich bei der Kristallbildung von Wasser. Reines Wasser würde normalerweise unterhalb 0°C zu Eis kristallisieren. Doch hierzu sind Nukleationsvorgänge notwendig. Fehlen Faktoren, welche die Nukleation begünstigen, z.B. Staubpartikel, rauhe Gefäßoberflächen und Ionen, so kann man absolut reines Wasser bis -30°C abkühlen, ohne daß es zum Gefrieren kommt (Garside 1982).
Bei der biologischen Mineralisation werden verschiedene Faktoren diskutiert, welche eine Nukleation des Calciumphosphates erleichtern. Bereits seit langem ist dies für die kollagenen Fasern beschrieben. Es besteht eine deutliche Beziehung zwischen den Fibrillen und der Anordnung der Kristalle. Welche Strukturkomponente für die Nukleation verantwortlich ist, ist umstritten. Während Fleisch (1982) eine mögliche Beziehung zu kovalent gebundenen Phosphatgruppen, die als o-Phospho-serin vorliegen, sieht, schlägt Posner (1978) Galaktosegruppen als Nukleationsstellen vor. Durch die Affinität dieser Nukleationsstellen zum Calcium oder Phosphat kommt es wahrscheinlich zu einer Ausrichtung der Ionen, welche der Anordnung im späteren Kristallgitter ähnelt. Neben dem Kollagen werden auch verschiedene Glykoproteine, die teils charakteristisch für das Knochengewebe sind, als Nukleationsstellen diskutiert. Im Vordergrund steht hier das Osteocalcin (oder auch calcium-bindendes Protein), das eine hohe Affinität zu ionischem Calcium aufweist. Nach Hauschka und Gallop (1977) ist die Bindungsfähigkeit für Calcium selektiv und Barium wie auch Strontium konkurrieren nicht signifikant. In Organkulturen konnte gezeigt werden, daß das Osteocalcin exakt zu dem Zeitpunkt erstmalig nachgewiesen wird, zu dem die Mineralisation einsetzt. (Hauschka und Reid 1978) Jedoch ist die physiologische Bedeutung des Glykoproteins noch weitgehend unbekannt. Die Rolle der Matrixvesikel bei der Mineralisation und speziell auch bei der Nukleation ist ebenfalls weitgehend ungeklärt. Bei diesen Strukturen handelt es sich um ca. 100 nm große Gebilde mit einer dreischichtigen Membran. Sie werden im Rahmen des Mineralisa-

tionsprozesses von Osteoblasten bzw. Chondrozyten abgesondert. Es ist allgemein akzeptiert, daß das erste Auftreten von abgelagertem Knochenmineral in und um die Matrixvesikel erfolgt. Der hierfür verantwortliche Mechanismus ist unklar. Biochemische Untersuchungen haben gezeigt, daß Matrixvesikel reich an Phosphat, alkalischer Phosphatase, Pyrophosphatase, ATP und Magnesium sind. Nach Absonderung der Vesikel in die Matrix, löst sich die Membran auf, und es treten ATP und Magnesium aus, welche zuvor im Vesikel die Bildung des Hydroxylapatits verhindert haben (Posner 1978). Diese geschilderten Vorgänge scheinen bei der Mineralisation im Knochen abzulaufen, während die Rolle der Matrixvesikel im Knorpel offensichtlich nicht mit deren Funktion im Knochen identisch ist. Ali (1976) zeigte an Schnitten aus der hypertrophen Knorpelzone der Epiphysenfuge, daß die von den Chondrozyten abgesonderten Vesikel anfänglich kein Calcium und Phosphat enthalten. Erst in der Matrix kommt es durch aktive wie passive Prozesse zur Aufnahme von Calcium und Phosphat, wodurch eine Erhöhung des Ionenproduktes zustande kommt. Diese Theorie würde der Einteilung nach zur erstgenannten Sättigungstheorie passen.

1.1.4.2.3. Inhibitionstheorie

Neben Strukturen wie den kollagenen Fasern, welche vermutlich durch Nukleation die Mineralisation fördern, existiert andrerseits eine Reihe von Substanzen, die sowohl die Aggretation von Calciumphosphatkristallen als auch das Kristallwachstum hemmen. Im Falle einer einsetzenden Mineralisation ist hier ein Abbau dieser "Mineralisationshemmer" erforderlich. Wenn dieser Abbauvorgang enzymatisch, lokal gesteuert werden kann, so wäre die Inhibitionstheorie eine mögliche Antwort auf die Frage, warum Gewebe, deren extrazelluläre Matrix dem Knochen sehr ähnlich ist, nicht mineralisieren. Die erste Substanz, von der solche Eigenschaften bekannt wurden, ist das anorganische Pyrophosphat. Die Verbindung hemmt die Bildung und das Wachstum von Hydroxylapatitkristallen und verlangsamt die Umwandlung von amorphem

Calciumphosphat in Apatit. Dieser Effekt ist ebenso in vitro sichtbar und erfordert Konzentrationen, die in physiologischen Größenordnungen liegen. Sowohl Plasma, Urin und Speichel als auch die Synovialflüssigkeit enthalten Pyrophosphat in ausreichend hohen Konzentrationen um das Kristallwachstum zu hemmen. Die Spaltung des Pyrophosphates in vivo erfolgt durch alkalische Phosphatasen. Wie bereits vorangegangen erwähnt, spielen gerade diese Enzyme bei metabolischen Prozessen des Knochengewebes eine entscheidende Rolle. Klinisch wird dies z.B. dahingehend ausgenutzt, daß man durch Bestimmung der alkalischen Phosphatase im Serum eine Kenngröße für den Knochenumbau erhält. Lokal ist durch die Osteoblasten, welche reich an alkalischer Phosphatase sind, eine Spaltung in Phosphat möglich, wodurch einerseits das Löslichkeitsprodukt des Calciumphosphates ansteigt, andererseits der Hemmeffekt des Pyrophosphates auf die Kristallisation aufgehoben wird. Diese Überlegungen konnten jedoch experimentell bislang noch nicht bestätigt werden.

Als weitere Stoffe mit mineralisationshemmenden Effekten, werden die Proteoglykane des Knorpels betrachtet. Am Übergang der Proliferationszone in die Calcifikationszone ist ein deutlicher Abbau der Proteoglykansuperaggregate zu deren Untereinheiten zu erkennen. Dadurch werden vermutlich vermehrt anionische Bindungsstellen dieser Makromoleküle frei, die dann ihrerseits Ca-Ionen binden können. Die Hemmwirkung auf das Kristallwachstum, die Präzipitation von Hydroxylapatit und die Mineralisation lassen sich auch in vitro zeigen (Blumenthal et al. 1979 , Suzuki et al. 1981). Jedoch gibt es einige Untersuchungen, die die Rolle der Proteoglykane während der Mineralisation in Frage stellen. Beispielsweise konnte der Abbau der Superaggregate zu Untereinheiten alleine kaum die inhibitorische Wirkung der Proteoglykane in vitro mindern (Blumenthal et al. 1979). Hinzu kommen elektronenmikroskopische Befunde, die den Abbau von Proteoglykanen weniger mit der einsetzenden Mineralisation als mit der Ausbildung der Markhöhle in Verbindung bringen (Scherft et al. 1984). Schließlich ist das Magnesium in diesem Zusammenhang erwähnenswert. Neben der essentiellen Bedeutung des Kations für die Funktion

einer Reihe von Enzymen, gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang mit der Mineralisation. Vor allem bei der Nukleationstheorie wird die Hemmung der Magnesiumionen auf die Appatitkristallisation in den Matrixvesikeln diskutiert.

1.1.5. Mechanismus der Knochenresorption

Unter Knochenresorption versteht man die Auflösung der gesamten extrazellulären Knochenbestandteile, d.h. sowohl des Minerals als auch der organischen Matrix (Fleisch 1981). Eine Dissoziation beider Vorgänge kommt normalerweise vermutlich nicht vor. Eine physiologische Notwendigkeit der Knochenresorption ist gegeben einerseits, um das Skelett Wachstumsvorgängen und Differenzierungsprozessen zugänglich zu machen, und andrerseits um die Knochensubstanz mit in die Homöostaseprozesse zur Aufrechterhaltung des Elektrolyt- und Säure-Base-Gleichgewichtes einzubeziehen. Bezüglich der zweiten Funktion wurde von Fleisch der Begriff der Ionen-Bank für das Skelett geprägt (Fleisch 1981). Im Gegensatz zu früheren Überlegungen muß die Knochenresorption als ein äußerst komplexer Vorgang betrachtet werden, an dessen Regulation eine noch nicht zu übersehende Zahl von lokalen und systemischen Faktoren beteiligt ist. In vieler Hinsicht kommt den lokalen Faktoren hierbei eine besondere Bedeutung zu, da zur physiologischen Knochenresorption die genaue örtliche Beschränkung auf das zu resorbierende Areal gehört. Deutlich wird dieser Aspekt z.B. beim Knochenanbau während des Wachstums. Hierbei ist mit dem äußeren Anbau neuer Knochensubstanz ein Abbau von Innen verbunden, der eine unkontrollierte Verdickung der Knochen verhindert. Es laufen also beide gegenteiligen Prozesse an engumschriebenen Orten gleichzeitig ab. Von Interesse in diesem Zusammenhang ist beispielsweise auch, daß bestimmte Strukturen sensibel auf eine provozierte Resorption reagieren, während andere scheinbar physiologisch gegen die Resorption geschützt sind. So konnten Liu u. Baylink (1984) an Rattenkiefern zeigen,

daß Calciummangel in der Nahrung die Anzahl der Osteoklasten im Endosteum steigert, während die Zahnfächer, die für den mechanischen Halt des Zahnes von größter Bedeutung sind, von diesem Vorgang nicht betroffen waren.

Unter den Zellen, die an der Knochenresorption beteiligt sind, haben offensichtlich die polynuklearen Osteoklasten die größte Bedeutung. Im Gegensatz zu den Osteoblasten stammen sie nicht von den Mesenchymzellen ab, sondern entwickeln sich wahrscheinlich aus mononuklearen Zellen des hämatopoetischen Systems (Severson 1983). Bei der Resorption zeigen die Osteoklasten eine enorme Leistungsfähigkeit. Sie vermögen etwa die hundertfache Menge an Knochensubstanz pro Zeiteinheit abzubauen, die durch einen Osteoblasten gebildet wird. Jedoch müssen an der Regulation der Osteoklastentätigkeit andere Zellen beteiligt sein. Vor allem die Osteoblasten wurden in diesem Zusammenhang diskutiert. Dies erscheint zunächst paradox, da doch die Hauptfunktion der Osteoblasten der Knochenanbau ist. Doch viele Untersuchungen haben gezeigt, daß die Osteoblasten sehr wohl auf Stimuli der Knochenresorption ansprechen. So führt Parathormon zur Adenylatzyklasestimulation, Hemmung der Kollagensynthese und Hemmung der alkalischen Phosphataseaktivität von Osteoblasten. Daneben kommt es zur Formveränderung der Osteoblasten, die dadurch weniger dicht gepackt sind. Rodan et al. (1981) sehen ein Zusammenspiel der Osteoblasten und Osteoklasten bei der Knochenresorption. Durch die Gestaltveränderung der Osteoblasten wird den Osteoklasten der Zutritt zur Knochenoberfläche ermöglicht, wodurch erst eine Resorption stattfinden kann. Ebenfalls direkt an der Knochenresorption beteiligt sind die Osteozyten, wobei Ausmaß und Funktion dieser Form der Osteolyse nicht bekannt sind. Chambers et al. (1980) schreiben den Osteozyten in einer Übersichtsarbeit zwei Hauptfunktionen bezüglich der Knochenresorption zu: Einmal der periodische Ab- und Anbau des perilakunaren Knochens (eine spezielle ca. 1 µm dicke Schicht, die den Osteozyten umgibt), zum anderen Resorptionstätigkeit in unmittelbarer Nachbarschaft zu aktiven Osteoklasten. Aus letzterem läßt sich wiederum auf eine direkte Wechselwirkung zwischen den Osteoklasten und den anderen

Knochenzellen schließen.
Bei den Stoffen, die die Knochenresorption beeinflussen, muß zwischen den systemischen und lokalen Faktoren unterschieden werden. Zu den systemischen Faktoren gehören das Parathormon und das 1,25-Dihydroxycholecalciferol, der physiologisch aktive Metabolit des Vitamin D_3. Während diese beiden Wirkstoffe die Knochenresorption auslösen und teils über ein Zusammenwirken an anderen Organen (z.B. Niere) den Plasma-Calcium-Spiegel anheben, ist das Calcitonin an der Hemmung der Knochenresorption und Senkung des Plasma-Calcium-Spiegels beteiligt. Dieser Regelkreis ist in der Lage den Calciumspiegel sehr genau auf einen bestimmten Bereich einzustellen.
Während die systemischen Faktoren der Knochenresorption bereits relativ lange bekannt sind, handelt es sich bei den lokal im Knochen wirksamen um Verbindungen, die erst in jüngster Zeit erkannt worden sind und zum großen Teil noch nicht genau charakterisiert werden konnten. Solche Faktoren mit fördernden Einfluß auf die Knochenresorption sind die Prostanoide (vor allem PGE_2), und der Osteoclast-activating-factor (OAF), ein proteinhaltiges Makromolekül. Die beiden Substanzen zeigen eine synergistische Wirkung. Während Monozyten Prostaglandine der E-Serie synthetisieren, werden hierdurch Lymphozyten zur OAF-Produktion stimuliert (Toshiyuki et al.1979, Fleisch 1981). Dieser Prozess kann durch steroidale wie nichtsteroidale Antiphlogistika unterbrochen werden. Letzlich beeinflußt der OAF dann direkt den Osteoklasten. Darüber hinaus sind Abbauprodukte der Knochenmatrix weitere lokale Faktoren für die Regulation der Knochenresorption. Vor allem werden hierbei Produkte des Kollagenabbaus diskutiert. Daneben scheinen Zerfallsprodukte der Glykoproteine des Knochens eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten zu haben. Die Beurteilung der lokalen Faktoren bei der Knochenresorption ist vor allem deshalb sehr unvollständig und problematisch, da sie analytischen Methoden schwer zugänglich sind. Die meisten Befunde auf diesem Gebiet stammen aus in vitro Versuchen. Selbst diese sind noch unvollständig, da die vermuteten Substanzen sich bisher nicht rein genug und in ausreichender Menge isolieren ließen, um sie

charakterisieren zu können; zu dem sind noch keine Antikörper für ihren Nachweis verfügbar (Reynolds 1983). Die chemischen Abläufe bei der Knochenresorption sind ebenfalls im Detail nicht bekannt. Vermutlich kommt es initial zur Auflösung der anorganischen Bestandteile und erst hierauf zur Degradation der organischen Matrix. Die Extrazellulärflüssigkeit ist bezüglich des Löslichkeitsprodukts von Hydroxylapatit gesättigt, so daß der Auflösungsprozess zunächst eine Veränderung der Löslichkeitsbedingungen an der Mineraloberfläche erfordert. Diese lokale Veränderung des extrazellulären Milieus kann sich in dem von den Osteoklasten nach außen abgegrenzten Raum zwischen sich und dem Knochen abspielen (Fleisch 1981). Dabei soll das tertiäre Phosphat durch Protonierung in das lösliche sekundäre bzw. primäre überführt werden. Die hierzu notwendigen Protonen werden vermutlich durch die Carboanhydrase zur Verfügung gestellt und nicht wie früher angenommen durch Produktion von Milch- und Zitronensäure. Diese Annahme wird gestützt durch die Befunde von Minking und Jennings (1972), die einen resorptionshemmenden Effekt der Carboanhydrase-Hemmer in vitro beschreiben. Die Aktivität der Calciumionen kann offensichtlich durch komplexbildende Substanzen erniedrigt werden. Nachdem allerdings die Bedeutung der Laktat- und Zitrationen für die Resorption in Frage gestellt wird, bleibt offen, welche vermutlich organische(n) Verbindung(en) für die Komplexierung zur Verfügung stehen. Der Abbau der organischen Matrix wird durch extrazelluläre, enzymatische Degradation bewerkstelligt. Die Enzyme, die hierzu in Frage kommen, sind vor allem Kollagenasen und lysosomalen Ursprungs. Die zelluläre Herkunft dieser Enzyme ist jedoch noch unklar, wobei es wahrscheinlich ist, daß sie eher von Osteoblasten stammen als von den eigentlichen resorbierenden Zellen den Osteoklasten (Reynolds 1983). Dieser Zusammenhang deutet wiederum darauf hin, daß die Knochenresorption nicht alleiniges Werk der Osteoklasten ist, sondern ein Zusammenwirken mit den Osteoblasten erfordert. Reynolds formuliert diesbezüglich die Hypothese, daß die Osteoklasten für die Entfernung des Minerals zuständig sind, und erst dann die organische Matrix der enzymatischen Degradation durch

die Osteoblasten zugänglich wird.

1.1.6. Physiologische Regulation der Mineralisation und Knochenresorption

Auf die Steuerung der Vorgänge zur Aufrechterhaltung der Calcium- und Phosphat- Homöostase soll nur kurz eingegangen werden. Im Vorangegangenen wurde für das Skelettsystem bereits der Begriff der Ionenbank genannt. Als solche spielt der Knochen eine entscheidende Rolle bei der Calciumregulation. Den Erfordernissen zur Konstanthaltung des Calciumspiegels in der Extrazellulärflüssigkeit und im Plasma entsprechend kommt es zur Einlagerung von Calcium in das Skelett. Hierbei muß vor allem verhindert werden, daß eine Überschwemmung des Serums mit Calcium eintritt, welche angesichts der Mengenverhältnisse leicht denkbar wäre. Denn 99% des Gesamtkörpercalciums befindet sich im Knochen und dies entspricht einer Menge beim Erwachsenen Menschen von ca. 1,75 kg, während der gesamte Blutkreislauf nur 1,2 g Ca enthält. Dies ergibt eine Relation von 1:1500 (Dambacher 1982).
An der Calciumregulation sind neben dem Knochen noch der Dünndarm und die Niere beteiligt. Die Wirkstoffe, welche die Einstellung des Calciumspiegels beeinflussen, sind das Parathormon, die Metaboliten des Vitamin D und das Calcitonin. In einem doppelten Feedbackmechanismuns wirken Parathormon und Calcitonin zusammen. Dabei steigert das Parathormon die Calciumfreisetzung aus dem Skelett und fördert die Rückresorption in der Niere. Das $1,25(OH)_2$-D_3, der Hauptmetabolit des Vitamin D_3, hat ähnliche Wirkung wie das Parathormon, jedoch verursacht es zusätzlich eine vermehrte Calciumresorption aus dem Dünndarm. Während diese Prozesse den Calciumspiegel anheben, senkt das Calcitonin die Calciumkonzentration durch Verminderung der Mobilisation aus dem Skelett. Zusätzlich hemmt das Calcitonin die Calciumrückresorption in der Niere. Die Hauptangriffspunkte der Einflußfaktoren sind in Abb.4 schematisch dargestellt.

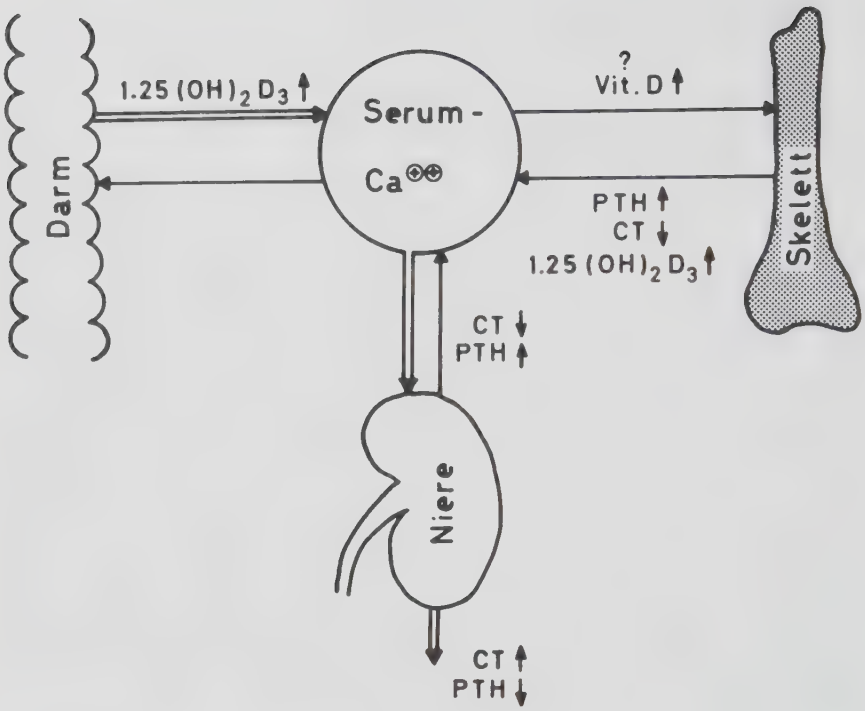


Abb. 4: Schematische Darstellung der Calciumhomöostase (modifiziert nach Dambacher 1982)
1,25-Dihydroxycholecalciferol ($1.25(OH)_2D_3$) fördert die Calciumresorption aus dem Darm und die Freisetzung aus dem Skelett. Parathormon (PTH) stimuliert die Freisetzung des Calciums aus dem Skelett und die Reabsorption in der Niere, wodurch eine verminderte Ausscheidung erfolgt. Calcitonin (CT) reduziert die Abgabe von Calcium aus dem Knochen und drosselt dessen Reabsorption in der Niere, woraus eine vermehrte Calciumausscheidung resultiert.
Eine direkte Steigerung des Calciumeinbaus in das Skelett durch Vitamin D_3 ist noch ungewiß.

1.1.7. Pathologische Veränderungen der Mineralisation und Knochenresorption

Aus der Vielfalt der pathologischen Veränderungen des Skelettsystems mit Defekten des Mineralhaushaltes, sei es eine mangelhafte oder eine vermehrte Mineralisation, sollen nur einige stellvertretend erwähnt werden. Die Auswahl hierbei soll nach den potentiellen Indikationen der geprüften Pharmaka erfolgen.

1.1.7.1. Osteodystrophia deformans Paget

Diese Osteopathie, auch als Morbus Paget bezeichnet ist relativ häufig (1-4% der Bevölkerung). Vor allem steigt die Inzidenz mit zunehmendem Alter (>55 J.) erheblich an. In 95 % der Fälle bleibt die Erkrankung ohne klinische Symptome, während laborchemisch bereits erhebliche Veränderungen meßbar sind. Die Krankheit befällt meist herdförmig bestimmte Teile des Skelettsystems. Als Folge einer exzessiv gesteigerten Knochenresorption mit gleichzeitigem überstürzten Knochenanbau sind die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum und die Hydroxyprolinausscheidung mit dem Urin stark erhöht. Daneben wird eine erhöhte Konzentration des Serumosteocalcins gemessen (Gundberg et al. 1983). Durch den pathologisch gesteigerten Knochenumbau kommt es zur Vergrößerung der Knochen mit plumper Spongiosastruktur und im fortgeschrittenen Stadium bildet sich ein minderwertiger Geflechtknochen. Hinzu kommt oft eine Unterminerälisation, d.h. Zunahme von Osteoidsäumen, auch als Osteoidose oder Pseudoosteomalazie bezeichnet (Dambacher 1982). Die Hauptkomplikationen, die sich aus diesen Knochenveränderungen ergeben, sind Deformationen, verbunden mit Schmerzen, pathologische Frakturen und neurologische Symptome. Letztere sind zum Teil auf Kompression der Nerven zurückzuführen. Bei einer möglichen Taubheit gesellt sich die Verschlechterung der Leitfähigkeit des erkrankten Knochens hinzu. In seltenen Fällen ist durch Kompression des Rückenmarks

auch eine Paraplegie beschrieben worden. Schließlich ist eine sarkomatöse Entartung des erkrankten Knochengewebes möglich.
Die Ätiologie der Erkrankung ist nicht bekannt. Jedoch sprechen viele Hinweise für eine pathologische Veränderung der Osteoklasten. Die Paget-Osteoklasten unterscheiden sich von normalen Osteoklasten durch eine deutlich gesteigerte Aktivität, und eine größere Anzahl von Zellkernen. Ebenso ist ihre Anzahl im befallenen Knochen erhöht (Schulz und Delling 1982). Häufig sind in den Zellkernen der Paget-Osteoklasten parakristalline Einlagerungen beschrieben worden, die der Diskussion über die Ätiologie neue Aspekte gegeben haben. Sowohl die Einlagerungen im Zellkern als auch die Beschreibung von viralen Antigenen in Osteoklasten, (Rebel et al. 1980) wie andere immunologische Veränderungen, lassen einen viralen Ursprung der Erkrankung vermuten (Buxbaum et al. 1984). Die virusinfizierten, mononuklearen Vorläuferzellen der Osteoklasten führen zu einer erhöhten Fusionsrate und geben den zytopathogenen Effekt an die Osteoklasten weiter (Schulz und Delling 1982).

1.1.7.2. Osteoporose

Die Osteoporose ist definiert als ein Zustand, der durch Skelettverlust über die normale Altersatrophie hinaus charakterisiert ist. Wichtig ist hierbei die Abtrennung von der normalen Skelettrarifizierung im Alter. Beide Vorgänge werden unter dem Begriff der Osteopenie zusammengefaßt (Dambacher 1982). Das Verhältnis von Mineralanteil zu Grundsubstanz ist bei der Osteoporose im Gegensatz zur Osteomalazie normal. Die Osteoporose ist eine recht häufige Erkrankung mit einer Inzidenz von etwa 12% der Gesamtbevölkerung. Die Bedeutung der Erkrankung zeigt sich vielleicht an der Tatsache, daß 35% aller Frakturen bei Frauen über 45 Jahren auf eine Osteoporose zurückzuführen sind. Das häufige Auftreten bei Frauen ist wahrscheinlich durch die geringere Skelettmasse bedingt, wobei aber genetische Faktoren nicht ausgeschlossen

werden können.
Als Hauptsymptom der Erkrankung ist eine erhöhte Neigung zu Frakturen vor allem an Wirbelkörpern, Schenkelhals, Humerus, Radius u.a.m. zu nennen. Durch Verformungen der Wirbelkörper kann es zur Gibbusbildung und zur Größenabnahme kommen. In Folge der durch die Skelettveränderungen bedingten Haltungsschäden werden Bänder, Sehnen und Muskeln mit in das Geschehen einbezogen und sind neben den direkten Frakturschmerzen an der gesamten Schmerzsymptomatik beteiligt. Pathogenetisch liegt bei der Osteoporose ein verminderter, relativer Knochenanbau vor, entweder bedingt durch eine absolute Verlangsamung der Anbauvorgänge (Osteoporose mit niedrigem Knochenumsatz) oder bedingt durch eine übermäßige Knochenresorption (Osteoporose mit gesteigertem Knochenumsatz). Ätiologisch unterteilt man die Osteoporose in 2 Kategorien: Die primäre und die sekundäre Osteoporose. Etwa 95% der Osteoporosen gehören zu den primären, d.h. solchen ohne bekannte Ursache. Kausale Zusammenhänge mit dem Auftreten dieser, auch als idiopathische Osteoporose bezeichneten Form, mit dem Östrogenausfall in der Menopause (auch Ovarektomie), mit Gefäßveränderungen (etwa durch Diabetes und Rauchen), der Calciumzufuhr bzw. einer Zunahme des Parathormons werden kontrovers diskutiert. Die sekundäre Osteoporose ist dagegen ursächlich auf andere Erkrankungen, auf bestimmte Pharmaka oder Genußmittel zurückzuführen. Als einige der häufigsten Auslöser einer sekundären Osteoporose seien genannt: Steroidtherapie (bei Asthma bronchiale oder rheumatischen Erkrankungen), Cushingsyndrom, Immobilisierung (auch Schwerelosigkeit) Rheumatische Erkrankungen, Hyperthyreose und Alkoholismus.

1.1.7.3. Myositis ossificans progressiva

Bei dieser relativ seltenen Erkrankung kommt es zur Schwellung eines Muskels mit anschließender Verknöcherung. Erste Schübe der Krankheit treten meist im Kindesalter spontan oder nach gering-

fügigen Traumen auf. Nach einer schmerzhaften, manchmal fieberhaften Schwellung des betroffenen Muskels, klingt die Symptomatik in wenigen Tagen ab und das Gewebe verhärtet. Sehr häufig werden Muskeln im Nacken- und Rückenbereich befallen, wodurch die Beweglichkeit beträchtlich eingeschränkt werden kann. Eine lebensbedrohliche Komplikation ergibt sich aus der verminderterten Dehnbarkeit des Brustkorbes, mit reduzierter Vitalkapazität, was zu schweren Pneumonien führen kann. Durch die eingeschränkte Beweglichkeit sind die Reflexbewegungen bei Stürzen verlangsamt und es kann zu schweren Verletzungen kommen. Die Ätiologie der Erkrankung ist unbekannt. Eine genetische Disposition liegt vor und die Krankheit tritt weit häufiger bei Kindern älterer Väter auf (Weicker 1976). Eine Vielzahl quergestreifter Muskeln kann von der vorerst progredient verlaufenden Krankheit befallen werden.

Histologisch ist eine exzessive Vermehrung der Bindegewebszellen zu finden. Die Fibroblasten differenzieren zu Chondroblasten und Osteoblasten. Es kommt zur Synthese großer Mengen kollagener Fasern und Glykosaminoglykanen, was zu einer Komprimierung und Degenerierung der Muskelzellen führt. Im späteren Stadium bilden sich Knorpel- und Knochennester, wobei ein ektopischer Knochen nach der desmalen und enchondralen Ossifikation entsteht. Das gebildete Knochengewebe ähnelt dem Kallus bei der Bruchheilung. Im betroffenen Muskel ist die knochentypische alkalische Phosphatase in hohen Konzentrationen zu finden. Auf Grund der histologischen Befunde wird die Myositis ossificans auch als Fibrodysplasie ossificans progressiva bezeichnet. Neuerdings vermutet man einen funktionellen Zusammenhang mit dem "Bone morphogenetic Protein". Mit diesem Protein läßt sich experimentell eine Myositis ossificans auslösen (Urist et al. 1978) bzw. ektopische Knochenbildung induzieren (Harakas 1984). Therapeutisch versucht man die Erkrankung durch hoch dosierte Kortikosteroide und Azathioprin zu beeinflussen. Doch ist die Wirksamkeit dieser Maßnahmen recht gering. Selbst nach chirurgischer Entfernung des ektopischen Knochengewebes, kehren die Verkalkungen, oftmals sogar verstärkt, zurück. Schnakenburg et al. (1982) berichten

über Therapieversuche mit Etidronsäure, die jedoch auch nicht die erwarteten Erfolge brachten, da der Zeitpunkt der Verknöcherung nur etwas hinausgezögert wurde.

2. Problemstellung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit sollten Probleme stehen, die im weiteren Sinne mit der biologischen Mineralisation und Knochenresorption zusammenhängen. Hierbei sollten einerseits physiologische Prozesse, andererseits aber auch pathologische Veränderungen dieser fundamentalen biologischen Vorgänge in die Betrachtung einbezogen werden. Da sich diese Prozesse weitgehend im Bindegewebe abspielen und eine eindeutige Beziehung zum Stoffwechsel der organischen Matrixbestandteile, dem Kollagen und den Proteoglykanen aufweisen, wurden die hierfür charakteristischen Parameter mit erfaßt. Das benutzte Arbeitsmodell, fetale, murine Tibiaanlagen, kultiviert in vitro, hat sich bereits in zahlreichen Arbeiten betreffend Fragestellungen zur Wirkung von Antiphlogistika oder Antarthrotika bewährt. Da Fragen der Mineralisation an diesem Arbeitsmodell bisher nicht bearbeitet worden sind, mußte zunächst eine Methode zur Bestimmung des Calciumgehalts der Explantate erarbeitet werden. Weiterhin mußten die Bedingungen für eine Mineralisation unter in vitro-Verhältnissen ermittelt werden. Bei früheren Untersuchungen an den Tibiakulturen standen Fragen des Einflusses von Pharmaka auf den Knorpelstoffwechsel im Vordergrund; daher wurden die Explantate hierbei in einem Entwicklungsstadium entnommen (18. Tag der Tragzeit), in dem sie vorwiegend noch ein knorpeliges Modell des späteren Röhrenknochens darstellen, wenn auch bereits deutliche Anzeichen der Ossifikation zu erkennen sind. Sowohl die beginnende Einlagerung von Mineral, als auch die Ausbildung einer primären Markhöhle ist nachzuweisen (Weischer et al. 1980). Da jedoch Fragen der Mineralisation mehr das bereits differenzierte, ossifizierte Gewebe

betreffen, sollten möglichst weit entwickelte Knochenanlagen untersucht werden. Diesem Bestreben sind durch das Arbeitsmodell gewisse Grenzen gesetzt. Einerseits hat fetales Ausgangsmaterial den Vorteil der leichten, sterilen Präparation, andererseits können bei kleineren Explantaten wegen ihres geringen Durchmessers Diffusionsprozesse zur Nährstoffaufnahme aus dem Kulturmedium leichter ablaufen. Auf Grund dieser Überlegungen sollte an fetalen Tibiaanlagen festgehalten, jedoch der Zeitpunkt ihrer Exzision möglichst weit zum Ende der Tragzeit verlagert werden. Um den Entwicklungsstand der Organanlagen besser beurteilen zu können, waren deren Veränderungen in utero während der letzten Tage der Tragzeit sowie im Laufe der ersten Tage nach dem Wurf zu untersuchen.

Nach Klärung dieser methodischen Voraussetzungen sollte das modifizierte Arbeitsmodell zur Prüfung von Verbindungen mit einer potentiellen Wirkung auf die Mineralisation benutzt werden. Im Vordergrund sollten dabei Bisphosphonate stehen, die seit einiger Zeit zur Behandlung des Morbus Paget und einiger anderer Osteopathien eingesetzt werden. Der Wirkungsmechanismus der Bisphosphonate ist bis heute nicht geklärt. Die eigenen Untersuchungen sollten dazu beitragen, die biologischen Effekte dieser Stoffe näher zu charakterisieren.
Die Mellitsäure wurde in die Untersuchungen einbezogen, da sie ähnlich den Bisphosphonaten eine besondere Affinität zu ionisiertem Calcium zeigt, obwohl strukturell keine Verwandschaft zwischen den Verbindungen besteht. Über die Wirkung der Mellitsäure auf biologische Systeme liegen nur wenige Untersuchungen vor. Bisher wurde lediglich über einen Hemmeffekt bei der Entstehung von Zahnstein berichtet. Wenn auch recht wenig über die Substanz und ihre pharmakologischen Wirkungen bekannt ist, zeigten Arbeiten von Zahndtke (1984), Bickel (1984) und Therapieversuche von Münzenberg bei der Myositis ossificans recht interessante Effekte, die auf eine therapeutisch günstige Beeinflussung heterotoper Ossifikationen hinweisen. Da bei den Wirkungen der Bisphosphonate und der Mellitsäure Zusammenhänge mit

ihren physikochemischen Eigenschaften bezüglich einer Komplexierung des ionisierten Calciums zu vermuten waren, bot es sich an, Untersuchungen über den Einfluß der Prüfstoffe auf den Ionisationsgrad des Calciums im Nährmedium durchzuführen.

Als weiterer Prüfstoff wurde das Natriumfluorid in die Arbeit einbezogen. Diese Substanz wird bereits seit einiger Zeit zur Therapie der Osteoporose eingesetzt und weist ebenfalls eine Beziehung zur Mineralisation und Matrixsynthese auf. Obwohl zum Teil sehr ausführlich über die Wirkungen des Natriumfluorids auf das Bindegewebe berichtet wurde, ist der Wirkungsmechanismus ungeklärt.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsobjekt

Als Versuchsobjekt dienten Tibiae fetaler NMRI-Mäuse aus institutseigener Zucht. Nach Präparation wurden die Explantate 6 Tage in einem künstlichen Nährmedium inkubiert.

3.1.1. Zucht der Mäuse und Bestimmung der Tragzeit

Die Zucht der Muttertiere erfolgte in Makrolonkäfigen (42,5 x 26,5 x 15 cm, Fa. Wenzel, Detmold), welche mit Hobelspänen ausgelegt waren und mit einem Metallgitter nach oben hin verschlossen wurden. Als Nahrung erhielten die Mäuse Hartfutter Altromin 1323^{R} und Leitungswasser ad libitum. Zum Deckakt wurde zunächst ein einzelner Bock für ca. 24 Stunden in einem Zuchtbehälter gehalten und anschließend wurden drei Weibchen über Nacht dazugesetzt. Am darauffolgenden Morgen wurde gemäß der Methode nach Jung (1962) untersucht, ob es zum Deckakt gekommen war. Hierbei bildet sich ein elfenbeinfarbener Pfropf in der Vagina, der aus koaguliertem Sperma und abgeschilferten Zellen besteht. Der Pfropf bleibt für ca. 9 Stunden erhalten. Die gedeckten Tiere wurden anschließend von den Böcken getrennt und bis zum Versuchstag gesondert gehalten. Um die erforderlichen 4-5 trächtigen Tiere für einen Inkubationsansatz zu erhalten, mußten ca. 30-50 Weibchen mit Böcken zusammengesetzt werden.

3.1.2. Präparation der Tibiae

Sämtliche Lösungen, Arbeitsgeräte und Gefäße wurden sterilisiert je nach Material durch Heißluftsterilisation, Autoklavieren bzw. durch Abwaschen mit Cetylpyridiniumchloridlösung. Nach 18,4($\pm$0,3) Tagen Tragzeit wurden die Muttertiere durch zervikale Dislokation getötet, die Bauchdecke mit zwei chirurgischen Pinzetten aufge-

rissen und das Bauchfell aufgeschnitten. Anschließend wurde der Uterus entnommen und in eine Petrischale gelegt. Die Entnahme der Feten erfolgte in einer sterilen Werkbank (Laminar Airflow System; Gelair Airflow class 100, Gelman Instrumente Mailand) Die Feten wurden in steriler physiologischer Kochsalzlösung bei 37°C bis zur Präparation der Tibiae aufbewahrt. Die Präparation erfolgte unter einem Stereomikroskop mit 10-facher Vergrößerung (Fa. Zeiss) in einer Plexiglaskammer, die durch Cetylpyridiniumchloridlösung und Ausstrahlen mit UV-Licht desinfiziert worden war. Die hinteren Extremitäten der Feten wurden mittels zwei Pinzetten (Dumont & Fils, Gr. 5) abgetrennt und auf ein Rundfilter (Selecta, Nr. 597/2, Ø 5,5cm, Firma Schleicher & Schüll) gelegt. Mit den gleichen Pinzetten erfolgte die Exzision der Knochenanlagen. Anhaftende Reste von Bindegewbe konnten durch vorsichtiges Rollen der Tibiae auf dem Filterpapier entfernt werden. Die Explantate wurden auf kleinen Edelstahlnetzen (35 x 20 x 5 mm, Drahtstärke 0,16 mm, Maschenweite 0,25 mm, Hersteller Gebr. Kufferath, Düren) gesammelt, welche sich in einer mit Nährmedium gefüllten Petrischale befanden. Die Explantate eines jeden Muttertieres wurden auf einem separaten Netz gesammelt. Um Pharmakaeinflüsse auf die isolierten Organanlagen zu untersuchen, wurden die Tibiae randomisiert und einer Kontrollgruppe bzw. Prüfgruppen mit unterschiedlichen Prüfstoffkonzentrationen zugeordnet. Pro Inkubationsansatz wurden einer Gruppe 12 Explantate zugeteilt. Die Anzahl der Prüfgruppen variierte zwischen 5 und 8. Jede Inkubation wurde mindestens 3x unter reproduzierbaren Bedingungen durchgeführt.

3.2. Versuchsanordnung

3.2.1. Inkubation

Die Versuchsanordnung ist schematisch in Abb. 5 wiedergegeben und entspricht im wesentlichen der von Hinrichs (1979) und Breuer (1979) beschriebenen Methode. Die Explantate wurden zu zwei

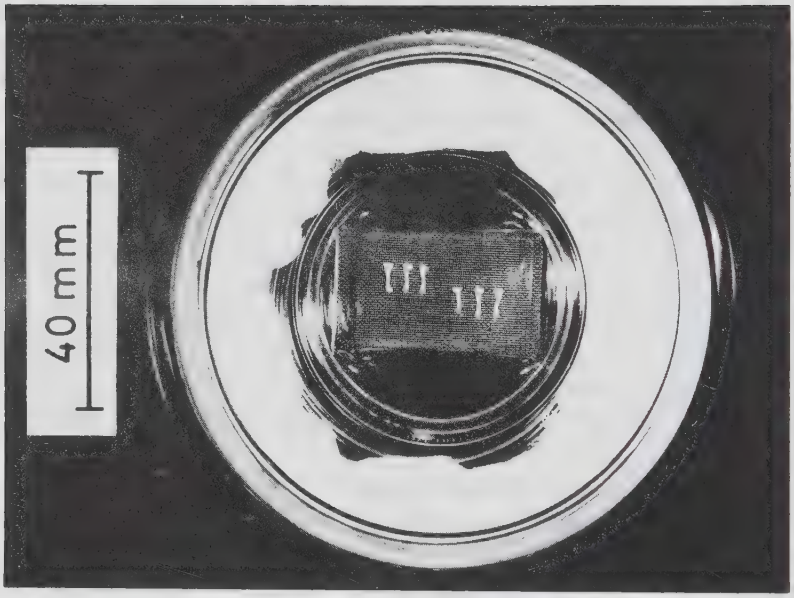


Abb. 5: Kulturen muriner fetaler Tibiaexplantate. Anordnung der Tibiae auf einem Edelstahlnetz in einer als Kulturgefäß dienenden, mit Nährmedium beschickten Petrischale, die sich in einem größeren, als feuchte Kammer fungierenden Glasgefäß befindet.

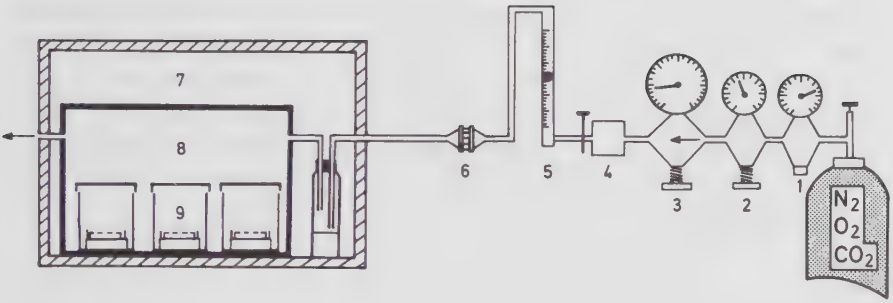


Abb. 6: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Begasung und Inkubation der Kulturen (1-3 Ventile zur Druckminderung, 4 Nadelventil zur Durchflußeinstellung, 5 Flowmeter, 6 Sterilfilter, 7 Inkubator, 8 Begasungskasten, 9 feuchte Kammer mit Petrischalen und Drahtnetzen)

Dreiergruppen auf eines der o.g. Stahlnetze gelegt, welche sich in einer mit Nährmedium gefüllten Petrischale (Jenaer Glas, Ø 43 mm) befanden. Die Nährmediummenge reichte gerade aus, um die Explantate von unten zu benetzen und mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm zu überziehen, ohne daß ein Abschwimmen möglich war. Die zu untersuchenden Substanzen waren im Nährmedium der entsprechenden Gruppen gelöst. Die offenen Petrischalen standen auf ihrem Deckel in einer Glasdose (Glashütte, Löhnberg Ø 10 cm) (Abb. 6), die als feuchte Kammer fungierte. Hierbei diente eine mit Wasser getränkte Rolle aus Verbandmull und Watte zur Anfeuchtung des Gasraumes über den Explantaten. Der Deckel dieser feuchten Kammer wurde durch sterilisierte Profilgummipuffer ca. 5 mm angehoben, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Je drei dieser feuchten Kammern befanden sich im eigentlichen Begasungsraum (Plexiglaskasten, 31,5 x 14,5 x 12 cm, Wandstärke 3 mm, Herstellung Werkstatt des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie, Bonn). An den Kopfseiten der Behälter befanden sich Ein- und Auslaßstutzen, durch die das Gasgemisch geleitet wurde. Zur Temperierung wurde der gesamte Aufbau in einen Brutschrank bei 37°C gestellt.

3.2.2. Begasung

Die Begasung erfolgte durch ein Prüfgasgemisch (Fa. Linde, München) bestehend aus 85 % Stickstoff, 10 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid. Über ein dreistufiges Ventil wurde der Druck reduziert, während die Durchflußmenge mit einem Flowmeter (Fa. Fischer und Porter GmbH, Göttingen 08-G-5/81) auf 10 l/h eingestellt wurde. Beim Hintereinanderschalten von vier Begasungskästen wurde damit ein vollständiger Gaswechsel inerhalb 1,8 Stunden erreicht. Zur Entkeimung des Gasgemisches wurde ein Sterilfilter (Firma Satorius SM 16213, Ø 50 mm, Edelstahl, Zellulosenitratfilter, SM 11304, Ø 50 mm, Porengröße 0,8 µm) zwischengeschaltet. Die Anfeuchtung erfolgte über eine Gaswaschflasche, welche sich mit sterilem Wasser gefüllt im Wärmeschrank

befand.

3.3. Nährmedium

Das Ausgangsnährmedium der Versuche geht zurück auf das von Hinrichs und Karzel (1979) modifizierte Medium nach Schindler. Auf Grund eigener Vorversuche wurde dieses Medium durch einen Zusatz von Natrium-ß-glycerophosphat (7,5 mmol/l) ergänzt.

3.3.1. Zusammensetzung

Elektrolyte:	NaCl	137,00 mmol/l
	KCl	5,36 mmol/l
	$CaCl_2$	1,24 mmol/l
	$MgSO_4$	0,81 mmol/l
	KH_2PO_4	0,44 mmol/l
	Na_2HPO_4	0,40 mmol/l
	$NaHCO_3$	11,90 mmol/l
Aminosäuren:	L-Arginin HCl	0,1 mmol/l
	L-Cystin	0,05 mmol/l
	L-Histidin	0,05 mmol/l
	L-Isoleucin	0,2 mmol/l
	L-Leucin	0,2 mmol/l
	L-Lysin HCl	0,2 mmol/l
	L-Methionin	0,05 mmol/l
	L-Phenylalanin	0,1 mmol/l
	L-Threonin	0,2 mmol/l
	L-Tryptophan	0,02 mmol/l
	L-Tyrosin	0,1 mmol/l
	L-Valin	0,2 mmol/l
	L-Glutamin	2,0 mmol/l

Vitamine:	Nicotinamid	0,5 mg/l
	Ca-Pantothenat	0,5 mg/l
	Pyridoxal HCl	0,5 mg/l
	Riboflavin	0,5 mg/l
	Thiamin HCl	1,0 mg/l
	Folsäure	10,0 mg/l
	Biotin	0,01 mg/l
	Ascorbinsäure	50,0 mg/l
Antibiotika:	Penicilin G	50,0 mg/l
	Streptomycin	50,0 mg/l
Sonstige:	Cholinchlorid	1,5 mg/l
	Inositol	1,5 mg/l
	Glucose	5,55 mg/l
	Pferdeserum	15,0 %
	Na-ß-glycerophosphat	7,5 mmol/l

Bei allen Versuchen mit Prüfstoffen wurde das gleiche Pferdeserum der Fa. Biochrom KG (Mykoplasmen getestet Chargen-Nr.:30650) benutzt. Sämtliche Lösungen wurden mit dreifach quarzdestilliertem Wasser hergestellt und anschließend über Asbestfilter (Firma Seitz) sterilfiltriert. Das frisch hergestellte Medium hatte einen pH-Wert von 7,9 - 8,2 und wurde für eine sechstägige Versuchsreihe im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Aus Stabilitätsgründen wurde die Ascorbinsäure erst unmittelbar vor dem Ver-

suchsbeginn bzw. vor jedem Mediumwechsel zugesetzt.

3.3.2. Mediumwechsel

Das Nährmedium wurde alle 48 Stunden gewechselt. Hierzu wurde das verbrauchte Medium nahezu quantitativ abgesaugt und durch frisches ersetzt. Um eine Kontamination der Kulturen zu vermeiden, wurden diese Arbeiten ebenfalls in der sterilen Werkbank durchgeführt. Gleichzeitig wurde der Gasfluß kontrolliert und gegebenenfalls nachjustiert.

3.4. Analytische Verfahren

3.4.1. Wachstum der Explantate

Das Explantatwachstum wurde mit Hilfe eines photographisch-planimetrischen Verfahrens ermittelt.

Geräte:

Zeiss Stereomikroskop II
Tubusaufsatz
Einstellokular 10 x
Mikroskopkamera Leica M 2
Kleinbildfilm Agfa Isopan 17 DIN
Vergrößerungsgerät Focomat Ic , Fa. Leitz
Halbtonpapier Agfa, Brovira, DIN 112
Planimeter, Fa. Ott, Kempten, Typ 30115

Die beschriebene Anordnung der Explantate auf den Edelstahlnetzen ermöglichte ein Photographieren der Explantate durch das Mikroskop unmittelbar vor und nach Inkubation. Die unter 10 facher Vergrößerung angefertigten Aufnahmen wurden unter standardisierten Bedingungen auf Halbtonpapier abgezogen, wodurch 45 fach vergrößerte Positive entstanden. Die Konturen der Explantate

wurden mit Bleistift umfahren, um sie anschließend mit dem Planimeter zu vermessen, sodaß für jedes Explantat der prozentuale Flächenzuwachs ermittelt werden konnte

3.4.2. Kombinierte Bestimmung von Protein, Hydroxyprolin, DNA und Uronsäure

Zur quantitativen Erfassung des Protein-, Hydroxyprolin-, DNA- bzw. Uronsäuregehaltes wurde eine Vierfachbestimmung ausgearbeitet, die eine Kombination der von Hinrichs (1979) bzw. Frey (1975) entwickelten Verfahren darstellt. Die Analytik beruht auf folgenden Einzelbestimmungen

Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951)

Die Proteinbestimmung basiert auf einer Reaktion von Kupfersalzen in alkalischer Lösung unter Entstehung von Chelatkomplexen, mit anschließender Reaktion des Komplexes mit Phosphormolybdän- und Phosphorwolframsäure unter Bildung eines blauvioletten Reaktionsproduktes. Für die Bildung des blauen Farbstoffes sind wahrscheinlich die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan verantwortlich (Richterich, 1968).

Hydroxyprolinbestimmung nach Stegemann (1958) modifiziert nach Herold (1970)

Die für das Kollagen spezifische Aminosäure Hydroxyprolin wird durch zwei nacheinander geschaltete Reaktionsschritte bestimmt:

1. Oxidationsreaktion:

In schwach saurem Milieu wird das Hydroxyprolin mittels Chloramin T decarboxyliert und dehydriert. Das Endprodukt der Reaktion ist

Pyrrol.

2. Kupplungsreaktion:

Im stark Sauren erfolgt Kupplung des Pyrrols mit p-Dimethylaminobenzaldehyd zu einem orange-roten Cyanin-Farbstoff.

DNA-Bestimmung nach Ceriotti (1952)

Durch Einwirken starker Säuren auf die DNA entstehen Furankörper, welche mit verschiedenen organischen Reagenzien zu Farbreaktionen führen. In diesem Falle wurde eine Mischung aus konzentrierter Salzsäure und Indol benutzt, wodurch in der Siedehitze ein rosagefärbtes Reaktionsprodukt entsteht. An der Umsetzung mit dem Reagenz sind wahrscheinlich nur die puringebundenen Desoxyribosen beteiligt. Andere Zucker und Aldehyde, die ebenfalls mit dem Indol reagieren, stören die Bestimmung nicht, da die Reaktionsprodukte durch Dichlormethan ausschüttelbar sind.

Uronsäure-Bestimmung nach Dische (1947), modifiziert nach Gregory (1960)

Das Reaktionsprinzip der Uronsäure-Bestimmung ist eine Farbreaktion zwischen der Hexuronsäure und Carbazol in konzentrierter Schwefelsäure. Nach Gregory läßt sich die Intensität und die Stabilität des Farbstoffes durch Zusatz von Borat erhöhen.

Geräte:

Schliffstopfenreagenzgläser	NS 12,5 10 cm lang NS 14,5 10 cm lang
Mikroreaktionsgefäße	Fa. Eppendorf Nr. 3810
Leerampullen 10 ml	Fa. Bayer AG, Leverkusen
Automatische Pipetten 100 µl, 400 µl, 500 µl Eppendorf Multipette	Fa. Eppendorf
Wasserbad mit Thermostat	Fa. Memmert
Zentrifuge Typ UJ 2	Fa. Christ
Mischgerät Typ Reax I	Fa. Heidolph
Spektralphotometer PMQ 3	Fa. Zeiss
Mikroküvette 10 mm Schichttiefe	Fa. Hellmann 182 OS
Halbmikroküvette 20 mm Schichttiefe	Fa. Hellmann 1o4 OS
Ultraschallgerät Labsonic 1510	Fa. B. Braun
Nadelsonde 4mm Ø	Fa. B. Braun
Digitalthermometer TT 7010	Fa. Sika, Kaufungen
Digitalthermofühler TF 15	Fa. Sika, Kaufungen
Propangas-Kartusche mit Brenneraufsatz	Fa. Campinggaz International, Frankfurt

Reagenzien für die biochemischen Analysen

1.Proteinbestimmung:

1-N-NaOH

Kupfersulfatlösung

a.:500mg $CuSO_4$ $5H_2O$ in 100,0 ml H_2O

b.:10,0g Na_2CO_3 und 100mg K-Na-tartrat in 500,0 ml H_2O

Beide Lösungen werden kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1:50 (a:b) gemischt.

Folin-Ciocalteus-Reagenz: Das Reagenz wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn mit Wasser im Verhältnis 1:2 gemischt.

Bezugssubstanz: Albumin aus Rinderserum
Fa. Serva, Heidelberg, Nr.11920

2. Hydroxyprolinbestimmung:

HCl 37%

Propanolpuffer: a.: 12,5 g Zitronensäure H_2O, 4,0 ml Eisessig, 30,0 g Natriumacetat 3 H_2O und 8,5 g Natriumhydroxid wurden in 250 ml H_2O gelöst.

b.: 250,0 ml der Lösung a wurden mit 122,0 ml n-Propanol und 50,0 ml H_2O gemischt. Die so erhaltene Mischung konnte 6 Monate verwendet werden.

Oxidationsreagenz: 352,5 mg Chloramin T in 2,5 ml H_2O wurden mit dem Propanolpuffer ad 25,0 ml aufgefüllt.

Färbereagenz: 3,75 g -p-Dimethylaminobenzaldehyd wurden in 15,5 ml-n-Propanol angeschwemmt und mit 6,5 ml $HClO_4$-conc. versetzt. Beide Reagenzien wurden erst unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.

Bezugssubstanz: L-Hydroxyprolin, Fa. Serva, Heidelberg, Nr. 25829

3. DNA - Bestimmung:

N -NaOH
Salzsäure 37 %
Dichlormethan p.a.
Indollösung 0,04 % : 40 mg Indol wurden unter Erwärmen in 100,0 ml Wasser gelöst. Die Lösung hatte bei 4°C eine Haltbarkeit von ca. 6 Wochen.

Bezugssubstanz: Desoxyribonucleinsäure aus Heringssperma, entfettet, sehr weitgehend abgebaut; Fa. Serva Nr. 18580

4. Uronsäure - Bestimmung:

Borat-Schwefelsäure: 19,05 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ wurden in 50 ml H_2O aufgeschwemmt und unter Kühlung mit konz. H_2SO_4 in kleinen Anteilen auf 2000,0 ml aufgefüllt.

Carbazol-Lösung:	150 mg Carbazol wurden in 100 ml Methanol gelöst.
Zinn II chlorid-Lösung:	7,4 mg Zinn II chlorid wurden in 35 ml H_2O aufgeschwemmt und nach Zusatz von 2 ml 37%iger Salzsäure völlig gelöst
Bezugssubstanz:	D-Glukuronsäure Na-Salz, Fa. Serva, Nr. 22890

Ausführung:

Jeweils ein Tibiaexplantat wurde in einem Schliffstopfenreagenzglas NS 12,5 mit 1,25 ml 1-N-NaOH versetzt. Nach 60 Minuten im Wasserbad bei 45°C wurden die Proben abgekühlt und jeweils eine Minute mit der Ultraschallsonde bei 100 W behandelt. Anschließend wurden die Proben für weitere 120 Minuten bei 45°C im Wasserbad gehalten.(Trotz Ultraschallbehandlung und NaOH - Einwirkung blieb ein nicht aufzulösender Rückstand zurück, bei dem es sich um Calciumphosphate des Knochenminerals handelt, die in Lauge unlöslich sind.) Dieses Lysat wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und es wurden jeweils 100 µl in Mikroreaktionsgefäße für die Proteinbestimmung bzw. 150 µl in Leerampullen für die Hydroxyprolinbestimmung pipettiert.

Proteinbestimmung

Zu 100 µl des Lysats wurden 500 µl alkalische Kupfersulfatlösung gegeben, gemischt und 15 Minuten stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben mit 100 µl des Folinreagenz versetzt und durchmischt. Nach 90 Minuten wurde die Extinktion bei 730 nm gegen einen Leerwert aus 100 µl 1N NaOH mit den entsprechenden Reagenzien gemessen. Zur Messung wurden 400 µl der Lösung in eine Mikroküvette pipettiert. Die Ermittlung des Proteingehaltes erfolgte mit Hilfe von Eichlösungen (50, 100, 150, 200 u. 300 µg/ml Albumin), die bei jeder Bestimmung parallel zu den Proben behandelt wurden.

Hydroxyprolinbestimmung

Zu 150 µl des oben erwähnten Lysats wurden 150 µl 37 % HCl gegeben und die Ampullen mit einem Brenner zugeschmolzen. Es folgte eine Hydrolyse bei 120°C im Trockenschrank für 18 Stunden. Nach Abkühlen der Ampullen wurden diese geöffnet und bei 50°C im Wasserstrahlvakuum bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Wasser aufgenommen und anschließend mit 0,5 ml Oxidationsreagenz versetzt. Zur Oxidation des Hydroxyprolins wurden die Proben 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Darauf wurden 0,5 ml Färbereagenz zugesetzt und die Proben bei 60°C im Wasserbad 15 Minuten stehen gelassen. Nach Ablauf der Farbreaktion wurden die Proben unter kaltem Wasser abgekühlt und nach 25 Minuten am Photometer vermessen. Als Leerwert diente 1,0 ml Wasser mit den entsprechenden Reagenzien, der analog zu den Proben behandelt wurde. Die Eichlösungen (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 und 2,5 µg/ml) wurden parallel mit den Proben der Oxidations- und Farbreaktion ausgesetzt. Die Messung erfolgte bei 540 nm mit einem Meßvolumen von 400 µl in Mikroküvetten.

DNA - Bestimmung

Die restlichen 1,0 ml des Homogenats wurden im Schliffstopfenreagenzglas mit 500 µl eines Gemisches aus HCl 37 % und Indollösung 0,04 % (1:1) versetzt und 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben jeweils 3 x mit 2,0 ml CH_2Cl_2 auf dem Rotationsmischer ausgeschüttelt, um etwaige Reaktionsprodukte anderer Zucker oder Aldehyde zu entfernen. Nach dem letzten Extraktionsvorgang wurden die Proben zur besseren Phasentrennung 5 Minuten bei 2000 Upm zentrifugiert. Aus der wässrigen Phase wurden 400 µl mit einer Pipette vorsichtig entnommen und bei 490 nm photometrisch vermessen. Als Leerwert diente eine Mischung aus 1 ml NaOH mit den Reagenzien, die analog den Proben behandelt wurden. Die Eichlösungen enthielten 1,5, 3, 6, 12 bzw. 15 µg DNA/ml.

Uronsäurebestimmung:

In einem Schliffstopfenreagenzglas NS 14,5 wurden 3,00 ml Borat-Schwefelsäure mit 50 µl-Zinn IIchlorid-Lösung vermischt und im Gefrierschrank auf - 25°C abgekühlt. Hierauf wurden 500 µl des Überstandes der DNA-Bestimmung geschichtet und erneut auf - 25°C abgekühlt. Anschließend wurden die beiden Phasen vorsichtig unter dem Abzug vermischt, wobei es zur Wärmeentwicklung und heftigen Schaumbildung durch entweichende HCl kam. Nach Erwärmen der Proben im Glycerinbad auf 60 - 70°C wurde erneut durchmischt, wodurch ein weiterer Teil der Salzsäure entwich. Zur vollständigen Entfernung der Salzsäure und zur Hydrolyse der Glykosaminoglykane wurden die Proben im Glycerinbad für 15 Minuten auf 100°C erhitzt. Um weitere Salzsäurereste zu entfernen, wurden die Proben währen der letzten 5 Minuten noch einmal gut durchmischt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 100 µl Carbazollösung zugesetzt und auf 100°C für 10 Minuten erhitzt. Die Extinktion des entstehenden rötlicheen Farbstoffes wurde bei 530 nm gemessen. Zur Messung in den Halbmikroküvetten wurde das gesamte

Probenvolumen von ca. 3,5 ml benötigt. Als Leerwert dienten 500 µl DNA-Leerwert mit entsprechender Menge Borat-Schwefelsäure und Carbazollösung. Die Eichlösungen hatten einen Gehalt von 10, 15, 20, 25 bzw. 30 µg/ml.

3.4.3. Calciumbestimmung

3.4.3.1. Ermittlung des Calciumgehaltes der Explantate

Das erarbeitete Verfahren zur quantitativen Erfassung des Calciumgehaltes der Explantate beruht auf einer titrimetrischen Analyse des Erdalkalimetalls durch EGTA (Ethylenglykoltetraessigsäure) mittels eines Calcium Analysators der Fa. Corning GmbH. (Typ 940). Das EGTA ist ein hochselektiver Komplexbildner für Calcium, so daß andere Metalle die Bestimmung nicht stören. Als Indikator für die Titration diente Calcein, welches mit nicht komplex gebundenem Calcium im alkalischen Milieu einen grünen Fluoreszenzfarbstoff bildet. Die durch die EGTA-Titration verminderte Fluoreszenz (Quenching) wird photometrisch registriert und beim Erreichen der Grundfluoreszenz gestoppt. Das automatisch titrierende Analysengerät benötigt nur ein Probenvolumen von 20 - 100 µl in einer Konzentration von mindestens 0,5 mmol/l. Das geringe erforderliche Probenvolumen ist von Bedeutung für die Erfassung des Calciums in den Explantaten, da zum Auflösen der veraschten Organe nur 0,5 - 1 ml benötigt wurden und dadurch Konzentrationen von etwa 1,4 - 2,0 mmol/l erreicht werden konnten. Um eine geringe Fehlerbreite des Analysenverfahrens zu erreichen wurden immer 100 µl Probenvolumen zur Bestimmung benutzt. Dadurch konnten aus einer veraschten Tibia maximal 4 bzw. 9 Proben zur Parallelmessung und Mittelwertbildung benutzt werden.

Geräte:

Ultraschallbad	Fa. Gehardt
Muffelofen mit Regler	Fa. Simon Müller, Berlin
Allsint-Tiegel	Fa. Haldenwanger, Berlin
Mikroreagenzgefäße	Fa. Eppendorf Nr. 3810
Mischgerät Typ Reax I	Fa. Heidolph
Calciumanalyser 940	Fa. Corning

Reagenzien:

1-N-KOH	
EGTA-Lösung (Ethylenglykol-tetraessigsäure)	Fa. Corning
Calcein-Lösung	Fa. Corning
2,5 mmol/l Calciumstandardlösung	Fa. Corning
0,1 N HCl	

Ausführung:

Während die in Abbschnitt 3.4.2. genannten biochemischen Bestimmungen aus einem Explantat parallel durchgeführt werden konnten, erfolgte die Calciumbestimmung aus einem weiteren Explantat der selben Versuchsreihe. Die Explantate wurden jeweils in einen Tiegel aus Aluminiumsilikat gegeben und 2 Stunden bei 800°C im Muffelofen verascht. Nach Abkühlen ließ sich die Asche in Form eines kleinen, festen Zylinders aus dem Tiegel quantitativ in ein Mikroreagenzgefäß überführen, in dem die Auflösung in 0,1 N HCl im Ultraschallbad erfolgte. Je nach Menge der Asche wurde diese in 0,5 bzw. 1,0 ml HCl aufgenommen. Die Bestimmung am Calciumanalysator erforderte eine Probenmenmge von 100 µl, so daß mindestens 4 bzw. 9 Messungen jeweils einer Probe möglich waren. Zur Messung wurde die mit Magnetrührer ausgestattete Küvette mit KOH bis zur Marke gefüllt, 100 µl Calceinindikatorlösung wurden

zugesetzt und mit 100 µl Calcium-Standard-Lösung (2,5 mmol/l) geeicht. Anschließend wurden 100 µl Probenlösung zugesetzt und es erfolgte die automatische Titration. Nach ca. 30 Messungen mußte die Meßküvette geleert und erneut geeicht werden. In Abständen von 2 Monaten wurde die zur Auflösung der Asche benutzte HCl auf ihren Calciumgehalt untersucht und bei einem Gehalt von >0,02 mmol/l verworfen. Zur Herstellung der 0,1 N HCl wurde bidestilliertes Wasser benutzt, das ebenfalls vor Verwendung auf seinen Calciumgehalt untersucht wurde.

3.4.3.2. Bestimmung des ionisierten Calciums im Nährmedium

Neben dem Calcium in der Explantatasche wurde das Calcium im Nährmedium bestimmt. Mit dem bereits beschriebenen titrimetrischen Verfahren wurde das Gesamtcalcium erfaßt. Hinzu kommt die Bestimmung des ionisierten Anteils mittels einer ionensensitiven Elektrode.

Geräte:

Digitalpotentiometer	Fa. Orion Research 701 A
Calcium-Elektrode	Fa. Orion Research 93-20 Cambridge, Mass. USA
Referenzelektrode	Firma Orion 90-01
Magnetrührer	Fa. Janke und Künkel KG Staufen im Breisgau

Ausführung:

Durch Eintauchen der Elektrode in Calcium-Standard-Lösungen von 0,1 - 100 mmol/l wurde eine Eichkurve erstellt. Hierzu wurde die Potentialänderung gegen den Logarithmus der molaren Calciumionenkonzentration aufgetragen. Die Messungen erfolgten bei pH-Werten >5, da ansonsten die Empfindlichkeit der ionensensitiven Membran erheblich zurückging. Das erforderliche Meßvolumen betrug 50 ml. Um Potentialschwankungen zu vermeiden, mußte die Messung

unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührer erfolgen.

3.5. Statistische Auswertung

Zur Beurteilung des Verhaltens der Explantate unter in vitro-Bedingungen, das heißt Alternativfragestellung: inkubierte oder nicht inkubierte Tibia, wurde der t-Test benutzt.
Der Einfluß der verschiedenen Prüfstoffkonzentrationen wurde varianzanalytisch (Einwegklassifikation) untersucht. Ergab sich ein signifikanter Zusammenhang, so wurde der Vergleich der Mittelwerte aus den Prüfstoffgruppen mit dem der Kontrollen mit Hilfe der "linearen Kontraste nach Scheffé" durchgeführt. Die hierzu notwendigen Rechenoperationen wurden mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms (Multiplan Fa. Microsoft auf einem Apple IIe Rechner) durchgeführt. In das Programm eingearbeitet waren die erforderlichen Umrechnungen der Meßgrößen mittels Eichkurven zu den eigentlichen Ergebnissen (µg/Tibia bzw. % Flächenzuwachs). Die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) ist entsprechend in den Meßwerttabellen angegeben. Ein Wert $\geq 0{,}05$ wurde als statistisch nicht signifikant (Ø) bezeichnet. Die Prüfung auf eine Dosis-Wirkungs-Beziehung der untersuchten Stoffe erfolgte mittels Korrelations- und Regressionsanalyse. Die Gleichung der Regressionsgeraden, die Korrelationskoeffizienten und die Irrtumswahrscheinlichkeiten sind in Tabellenform angegeben. Eine Beziehung zwischen Dosis und Wirkung wurde angenommen, wenn $p < 0{,}05$ war. Wenn die Effekte der Prüfstoffe über den untersuchten Konzentrationsbereich keinen einheitlichen Verlauf ergaben, wurde die Regressionsanalyse für Teilabschnitte der Dosis-Wirkungs-Beziehung erstellt.
Die Angabe der Meßergebnisse erfogt in Tabellen, als Mittelwert ($\bar{x}$) und zweifache mittlere Abweichung des Mittelwertes ($\pm 2s_{\bar{x}}$, Vertrauensbereich des Mittelwertes 95.4 %). Um einen besseren Überblick über die Wirkung der Prüfstoffe zu bekommen, wurden die Ergebnisse zusätzlich in Prozentwerten, bezogen auf die Kontrollgruppe, angegeben.

Die graphischen Darstellungen zeigen in halblogarithmischer Form das gesamte Wirkprofil der Prüfstoffe in der Versuchsanordnung. Auf der Abszisse ist logarithmisch die Konzentration der untersuchten Substanzen aufgetragen. Die Effekte sind als "Prozente der Kontrollen" linear auf der Ordinate aufgetragen.

3.6. Prüfstoffe

Na-ß-glycerophosphat	Fa. Merck, Darmstadt Nr. 4108
Natriumfluorid	Fa. Merck Darmstadt Nr. 6449
Mellitsäure	EGA-Chemie Steinheim/ Albuch
1-Hydroxyethyliden-1,1-bisphosphonat (HEBP)	Fa. Boehringer, Mannheim
3-Amino-1-hydroxypropyliden-1,1-bisphosphonat (AHPrBP)	Fa. Ciba-Geigy, Basel
Propyliden-2,2-bisphosphonat (PrBP)	synthetisiert von Prof. Reimann, Pharmazeutisches Institut der Universität München

Die Prüfstoffe wurden dankenswerterweise von den o.g. Firmen bzw. Prof. Reimann in Form von Reinsubstanz zur Verfügung gestellt.

Die Prüfstoffe wurden im Nährmedium gelöst. Bei der Mellitsäure, HEBP und dem PrBP mußte der pH-Wert des Mediums durch Zusatz von 1-N-NaOH, beim Na-Salz des AHPrBP durch Zusatz von HCl eingestellt werden. Zur Untersuchung des Einflusses der Calcium-Konzentration des Nährmediums auf das Verhalten der Explantate wurde dialysiertes Pferdeserum benötigt. Dies war erforderlich, da durch den Zusatz von 15 % nicht-dialysiertem Serum die Calciumkonzentration des Mediums bereits 0,55 mmol/l betrug. Jedoch sollten auch niedrigere Calciumkonzentrationen untersucht werden.

Das dialysierte Pferdeserum (Fa. Biochrom KG) hatte einen Calciumgehalt von 0,5 mmol/l, wodurch eine Reduktion der Medium-Calciumkonzentration auf 0,1 mmol/l erreicht wurde.

4. Versuchsergebnisse

4.1. Entwicklung der Tibiae in vivo

Um den Entwicklungszustand der Tibiae im Hinblick auf den festzulegenden Präparationstag besser zu charakterisieren, wurden die Explantate 17, 18, 19, 20 bzw. 21 Tage nach Befruchtung analysiert. Darüber hinaus sollten diese Untersuchungen dazu dienen, das Verhalten der Explantate in vitro mit dem in vivo zu vergleichen. Es wurden sämtliche Parameter bestimmt, die auch später unter in vitro- Bedingungen erfaßt wurden. Hinzu kam eine Bestimmung des Körpergewichtes der Tiere. Normalerweise werfen die Mäuse der institutseigenen Zucht 19 Tage nach Befruchtung, so daß bei den gewählten Präparationszeiten auch die ersten drei Tage der postnatalen Phase mit erfaßt wurden.

Die erzielten Ergebnisse sind in Abb.7 zusammengestellt, und zwar in Prozentzahlen, die auf die Werte des 17. Tages bezogen sind, um das Wachstum der Tibiae bzw. die Gewichtszunahme der Tiere anschaulicher zu dokumentieren. Während das Gewicht der Feten bzw. Jungtiere, der Protein-, Uronsäuregehalt und die Größe der Tibiae (Fläche) vom 17.Tag zum 21.Tag um ca.160% zunahmen, stiegen der Hydroxyprolin- und Calciumgehalt der Explantate um ca.475 bzw. 625%. Aus diesen Relationen geht sehr deutlich die einsetzende Entwicklung des Knochengewebes hervor. Hierbei kommt es verstärkt zur Kollagensynthese und zur Calcifizierung der Explantate. Der DNA-Gehalt der Tibiae stieg zunächst vom 17. zum 20.Tag nach Befruchtung analog zu den nicht knochengewebsspezifischen Parametern an; in der folgenden 24h-Periode setzte sich

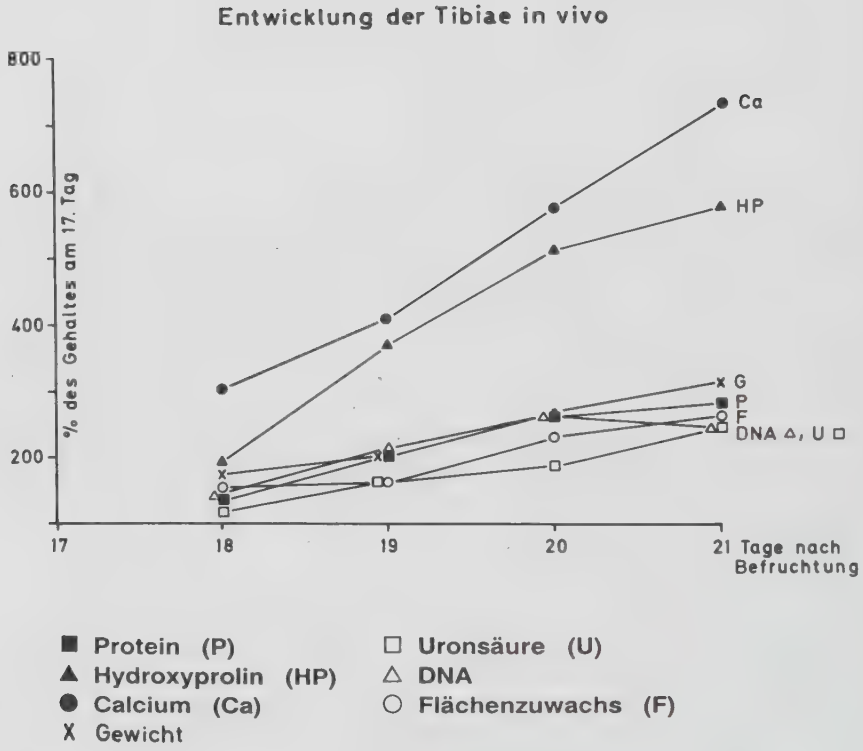


Abb. 7: Entwicklung der Tibiae von Mäusefeten bzw. Jungtieren in vivo zwischen dem 17. und 21. Tag nach Befruchtung. Angaben in Prozent unter Bezug auf den 17. Tag (= 100%)

dieser Anstieg nicht fort. Es kam vielmehr zu einer leichten Verminderung des DNA-Gehaltes. Der ausbleibende Zuwachs der Gesamtzellzahl mag eine Folge von Umbauprozessen sein, bei denen es einerseits zum Abbau von Knorpelsubstanz und -zellen kommt, andererseits kann hierfür die Entstehug der Markhöhle verantwortlich.

4.2. Mineralisation in vitro

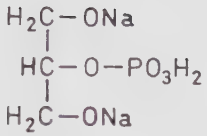
Grundvoraussetzung für eine Mineralisation von Organanlagen in vitro ist das Vorhandensein von Mesenchymzellen, die fähig sind zu Osteoblasten zu differenzieren. Dies zeigt sich an dem Phänomen, daß rein knorpelige Anlagen von Extremitäten in vitro zur Knochenbildung und Mineralisation erst fähig sind, wenn diese einen gewissen Reifezustand in situ erlangt haben. Ist in vivo noch nicht der Anstoß für eine spätere Differenzierung zu Osteoblasten erfolgt, kann in vitro keine Osteogenese mit nachfolgender Mineralisation eintreten. Die Knorpelzellen selbst scheinen nicht an der Ossifikation beteiligt zu sein und können auch nicht zu Osteoblasten differenzieren (Caplan 1983). Für Mäuse wird ein Einsetzen der Ossifikation zwischen dem 12. und 13. Tag angegeben (Shepard 1980). Im Vergleich hierzu reifen beispielsweise Ratten deutlich langsamer. Hier werden erste Ossifikationen zwischen dem 17. und 18. Tag der Tragzeit festgestellt.

Aus diesen Vorbemerkungen und den in Abschnitt 4.1. dargestellten Befunden ist abzuleiten, daß das am 19.Tag der Tragzeit gewonnene Ausgangsmaterial der vorliegenden Versuche vom Reifezustand her eine gute Voraussetzung zur in vitro-Mineralisation mitbrachte. Jedoch genügte dies alleine nicht. Vorversuche mit dem hier beschriebenen Arbeitsmodell zeigten keinen Einbau von Calcium in die Explantate während sechs-tägiger Inkubation. Die Zusammensetzung des Nährmediums entsprach der von Hinrichs (1979) angegebenen, die bereits zeigen konnte daß ohne Gegenwart von Ascorbinsäure im Medium keine Kollagensynthese möglich ist. Bei den dort bearbeiteten Problemen ging es vorwiegend um den Kollagen- und Glykosaminoglykanstoffwechsel. Um nun auch die Mineralisa-

tionsprozesse an einem in vitro-Modell untersuchen zu können, mußte das Nährmedium dahingehend variiert werden, daß ein Calciumeinbau in die Explantate erfolgen konnte.
In diesem Zusammenhang wurde der Einfluß einer organischen Phosphatverbindung als Zusatz zum Nährmedium untersucht.

4.2.1. Einfluß von Natrium-ß-glycerophosphat auf die Tibiakulturen

Neben dem Zusatz von Hormonen oder Wachstumsfaktoren zum Kulturmedium kann auch der Phosphatgehalt angehoben werden, um eine sonst ausbleibende in vitro-Mineralisation zu ermöglichen. Eigene Vorversuche konnten bestätigen, daß ein Erhöhen der Konzentration des anorganischen Phosphates zum Calciumeinbau in die Explantate führte. Jedoch sind hierfür Phosphatkonzentrationen notwendig, die über den physiologischen liegen, und es gibt Hinweise, daß unter diesen Bedingungen eine unspezifische Mineralisation erfolgt, die mehr Folge eines physikochemischen Effektes ist, als daß es sich um eine biologische Mineralisation handelt (Suzuki 1981). Dagegen enthält das verwendete Kulturmedium außer durch den Pferdeserumzusatz keine organischen Phosphate. Tennenbaum (1981) gibt einen Zusatz von 10 mmol/l Glycerophosphat zu einem definierten Medium ohne Serum an bzw. ergänzt den Gehalt von Plasmaclots mit 5 mmol/l um eine Mineralisation des Osteoids zu erreichen.
Um diese Frage für das eigene Versuchsobjekt zu klären, wurde in einer separaten Untersuchungsreihe Glycerophosphat als Na-Salz in Konzentrationen von 2 - 10 mmol/l dem Kulturmedium zugesetzt. Die erzielten Ergebnisse sind in Abb.8 sowie in Tab.1 u. 2 wiedergegeben. Unter Natriumglycerophosphat war eine dosisabhängige Zunahme des Calciumgehaltes der Explantate zu beobachten, während keine charakteristischen Veränderungen der übrigen Parameter eintraten. Der Calciumgehalt nach sechstägiger Inkubation war ab einer Konzentration von 3 mmol/l signifikant ($P<0,05$), bei 7,5 mmol/l hochsignifikant ($P<0,001$) gegenüber den Kontrollen erhöht. Das Wachstum der Explantate und die bestimmten biochemischen



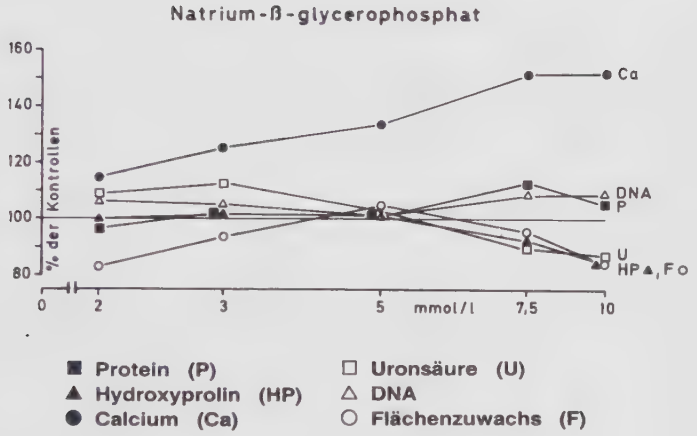


Abb. 8: Einfluß von Natrium-ß-glycerophosphat (2-10 mmol/l) auf sechs Tage in vitro kultivierte Tibiaanlagen. (Gehalt bzw. Flächenzuwachs in % der Kontrollen)

Tab.1: Einfluß von Natrium-ß-glycerophosphat (2 - 10 mmol/l) auf den Gesamtprotein- (Protein), DNA-Gehalt und auf den prozentualen Flächenzuwachs kultivierter Tibiaexplantate. (P = Ø = nicht signifikant) (/ug/Tibia)

		Kontrolle	2	3	5	7,5	10 mmol/l
Protein (n=18)	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	180,7±10,69	173,6±14,87	184,8±12,16	182,3±14,98	201,9±17,61	190,3±12,78
	%	100	96,04	102,24	100,90	111,72	105,30
	P		Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
DNA (n=18)	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	5,59±0,45	5,95±0,68	5,83±0,68	5,61±0,69	6,05±0,81	6,08±0,69
	%	100	106,38	104,32	100,31	108,21	108,79
	P		Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Fläche (n=36)	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	41,51±3,44	34,30±3,94	38,63±4,75	43,39±5,06	39,58±4,79	34,85±3,17
	%	100	82,64	93,05	104,52	95,35	83,95
	P		Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Tab.2: Einfluß von Natrium-ß-glycerophosphat (2 - 10 mmol/l) auf den Hydroxyprolin- (HP), Uronsäure- und Calciumgehalt kultivierter Tibiaexplantate. (P = Ø = nicht signifikant) (ug/Tibia)

		Kontrolle	2	3	5	7,5	10 mmol/l
HP	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	7,94±0,81	7,91±0,80	8,12±0,67	7,98±0,83	7,41±0,75	6,72±0,85
	%	100	99,56	102,16	100,42	93,32	84,57
(n=18)	P		Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Uron-	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	28,60±2,34	30,93±2,87	32,08±2,90	29,45±3,54	25,73±2,20	24,75±2,17
säure	%	100	108,12	112,16	102,96	89,95	86,55
(n=18)	P		Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Cal-	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	37,96±2,81	43,42±4,35	47,58±3,30	50,62±3,18	57,36±4,55	57,62±4,36
cium	%	100	114,40	125,35	133,37	151,11	151,81
(n=18)	P		Ø	0,05	0,005	0,001	0,001

Parameter zeigten bei keiner Konzentration eine statistisch signifikante Veränderung. Bei 5 mmol/l lagen sogar annährend alle Parameter außer dem Calciumgehalt bei 100 % bezogen auf die Kontrollen. Da sich der Calciumeinbau durch Zusatz von 7,5 mmol/l noch weiter steigern ließ, ohne daß andere Meßgrößen deutliche Veränderungen zeigten, wurde für die nachfolgenden Versuche mit Pharmaka eine Ergänzung des Kulturmediums mit 7,5 mmol/l Glycerophosphat gewählt. Eine Erhöhung der Glycerophosphatkonzentration auf 10 mmol/l bedingte keine weitere Zunahme des Calciumeinbaus in die Explantate, während eine Tendenz zur Minderung des Uronsäure- und Hydroxyprolingehaltes sowie des Flächenzuwachses erkennbar wurde, ohne daß diese Effekte statistisch bereits signifikant waren.

Natrium-ß-glycerophosphat:
Gleichung der Regressionsgeraden, Korrelationskoeffizienten und Irrtumswahrscheinlichkeiten der Korrelationskoeffizienten

		y=		r	p <
Protein	(0 - 10 mmol/l)	1,852x	+177,11	0,7077	0,001
DNA	(0 - 10 mmol/l)	0,040x	+ 5,67	0,6825	0,001
Fläche	(0 - 10 mmol/l)	-0,260x	+ 39,90	0,2667	Ø
HP	(0 - 10 mmol/l)	-1,223x	+ 8,24	0,8544	0,001
Urons.	(0 - 10 mmol/l)	-0,592x	+ 31,30	0,7610	0,001
Ca	(0 - 7,5 mmol/l)	2,533x	+ 38,52	0,9934	0,001
	(0 - 10 mmol/l)	2,038x	+ 39,75	0,9689	0,001

4.3. Verhalten der Explantate unter in vitro-Bedingungen

Als Grundlage für die Untersuchung von Pharmakaeinflüssen auf die kultivierten Tibiae wurde zunächst das Verhalten der Explantate unter Kontrollbedingungen ermittelt. Hierzu wurde jeweils ein Paarling eines Tibiapaares als Kontrollwert unmittelbar nach Exzision analysiert, der andere nach sechstägiger Inkubation.

Frühere Arbeiten mit dem unter 3.1. beschriebenen Versuchsmodell hatten gezeigt, daß die Tibiae unter den gewählten Versuchsbedingungen ca.11-12 Tage lebensfähig blieben (Frey 1975, Lee 1972). Weitere Modifikationen der Mediumzusammensetzung und des Begasungsgemisches wurden von Hinrichs (1979) eingeführt. Die Inkubationsdauer wurde auf sechs Tage festgelegt, da o.g. Untersuchungen (Frey 1975) ergeben hatten, daß die Syntheseleistungen bei längerer Inkubationszeit nachließen. Weitere Daten über das Wachstum der Tibiae in vitro sowie deren Protein-, Hydroxyprolin-, DNA- und Uronsäuregehalt finden sich bei Esser (1983) bzw. Kröschel (1983). Hinzu kamen histologische und histochemische Befunde von Weischer et al. (1980), welche die biochemischen Ergebnisse ergänzten und keine degenerativen Erscheinungen der Explantate während der Inkubation offenbarten.
Bei den eigenen Versuchen sollte primär die Mineralisation der Explantate betrachtet werden. Hierzu wurde das Versuchsmodell dahingehend verändert, daß die Tibiae nach 18 Tagen Tragzeit statt bisher 16-17 Tagen exzidiert wurden. Weiterhin wurde, wie unter 4.2. beschrieben dem Nährmedium 7,5 mmol/l ß-Glycerophosphat zugesetzt, um einen Calciumeinbau in die Explantate während der Inkubation zu ermöglichen. Die unter den modifizierten Bedingungen erhobenen Befunde sind in Tab.3 und Abb.9 zusammengefaßt.

Tab.3: Protein- (P), DNA- , Hydroxyprolin- (HP), Uronsäure- (U), Calciumgehalt (Ca) (in µg/Tibia) und Fläche (F) (in Planimetereinheiten) fetaler Tibiae vor bzw. nach 6-tägiger Inkubation:

	vor Inkub.	nach Inkub.	% Zuwachs	p(n=36)
P	154,38± 3,41	213,21± 8,53	38,10	0,001
DNA	10,29± 0,18	8,31± 0,24	-19,24	0,01
HP	5,34± 0,14	11,39± 0,36	114,04	0,001
U	21,21± 0,21	34,22± 0,89	62,00	0,001
Ca	38,50± 0,62	60,15± 1,29	56,23	0,001
F	87,89± 0,92	126,52± 2,00	42,83	0,001

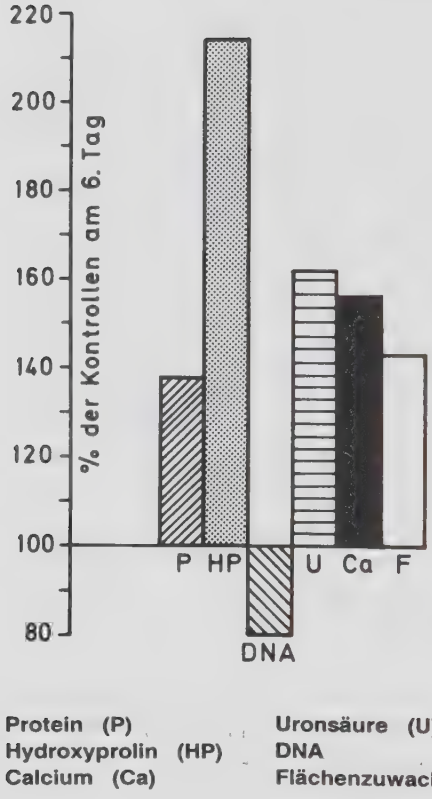


Abb. 9: Verhalten von sechs Tage lang in vitro inkubierten Tibiaexplantaten. Prozentuale Veränderung im Vergleich zu den Ausgangswerten zum Zeitpunkt der Exzision (18. Tag der Tragzeit).

Die Zuwachsraten der gemessenen Parameter zeigen ein deutliches Wachstum der Explantate. Vergleichbar dem unter 4.1. beschriebenen Verhalten in vivo ragt der Hydroxyprolinzuwachs mit ca. 110% bezogen auf die Kontrollen deutlich heraus. Neben dieser für den Kollagenstoffwechsel charakteristischen Größe stieg auch der Gehalt an Glykosaminoglykanen, was im Uronsäuregehalt zum Ausdruck kommt. Neben einem Proteinzuwachs von etwa 38% und einem Flächenwachstum von ca.42% kam es zum Anstieg des Calciumgehaltes der Explantate um durchschnittlich 56%. Der Vergleich von Kollagensynthese und Calciumeinbau der Tibiae in vitro und in vivo (Abb.7) offenbart jedoch, daß eine Mineralisation im lebenden Organismus deutlich stärker eintritt als unter Kulturbedingungen.

Im Gegensatz zu den bislang betrachteten Größen verminderte sich der DNA- Gehalt während der Inkubation um etwa 20%. Die ausführliche Disskussion dieses Phänomens soll unter 5.2. erfolgen. Vorbemerkend dazu soll nur festgestellt werden, daß die Abnahme des DNA-Gehaltes zwar auf eine Verminderung der Zellzahl hindeutet, daß hiervon aber offensichtlich nicht die in diesem Zusammenhang interessierenden spezifischen Zellen des Stützgewebes betroffen sind. Die erhaltene Vitalität der Osteoblasten und Chondroblasten ist unter anderem aus der besonders intensiven Kollagen- und GAG-Synthese ableitbar.

4.4. Einfluß einer modifizierten Calciumkonzentration des Nährmediums auf die Tibiakulturen

Da in der vorliegenden Arbeit Einflüsse von Substanzen auf die Tibiae untersucht werden sollten, die die Konzentration des ionisierten Calciums erniedrigen, wurde der Effekt der Calciumkonzentration des Nährmediums auf das Explantatverhalten geprüft. Ausgehend von der sonst üblichen Konzentration (1,51 mmol/l) ließ sich der Calciumgehalt auf 0,55 mmol/l erniedrigen, indem die Elektrolytzusammensetzung variiert wurde. Die verbleibenden 0,55 mmol/l kamen durch den 15%igen Serumzusatz zustande. Gleichzeitig

wurde der Einfluß einer leicht erhöhten Calciumkonzentration ermittelt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tab.4 u. 5 bzw. Abb. 10 dargestellt.

Um noch niedrigere Calciumkonzentrationen zu erreichen, wurde ein weiterer Versuch mit dialysiertem Pferdeserum angesetzt. Durch das dialysierte Serum konnte der Calciumspiegel im Medium auf 0,10 mmol/l gesenkt werden. Als Kontrolle diente das gleiche Medium mit zugesetztem Calciumchlorid, um die übliche Elektrolytkonzentration zu gewährleisten. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tab.6 bzw. Abb.11 dargestellt.

Abb.10 zeigt, daß ein reduziertes Calciumangebot mit dem Medium zu einem deutlich verminderten Calciumeinbau in die Explantate führte. Wenn auch keiner der übrigen Parameter einen statistisch signifikanten Unterschied zu den Kontrollen ergab, zeichneten sich tendenziöse Veränderungen ab. Das Wachstum wurde leicht vermindert, während der DNA-Gehalt praktisch unverändert blieb. Dagegen stieg der Kollagengehalt mit abnehmender Calciumkonzentration an. Ebenso war ein leichter Anstieg des Uronsäuregehaltes festzustellen.

Der Versuch mit dialysiertem Serum unterstrich diese Tendenzen. Bei unverändertem DNA- und Proteingehalt der Explantate waren Hydroxyprolin- und Uronsäuregehalt signifikant erhöht. Wie nicht anders zu erwarten, fiel der Calciumgehalt unter diesen Bedingungen noch weiter ab.

Beziehung zwischen Calciumkonzentration und Verhalten von Tibiae in vitro:

Gleichung der Regressionsgeraden, Korrelationskoeffizienten und Irrtumswahrscheinlichkeiten der Korrelationskoeffizienten:

		y=	r	p<
Protein	(0,55 - 1,81 mmol/l)	-16,76x +216,97	-0,6670	0,001
DNA	(0,55 - 1,81 mmol/l)	- 0,22x + 8,41	-0,4503	Ø
Fläche	(0,55 - 1,81 mmol/l)	0,99x + 43,57	0,2383	Ø
HP	(0,55 - 1,81 mmol/l)	- 1,14x + 9,93	-0,9602	0,001
Urons.	(0,55 - 1,81 mmol/l)	- 2,10x + 33,57	-0,6518	0,001
Ca	(0,55 - 1,81 mmol/l)	13,04x + 28,44	0,9779	0,001

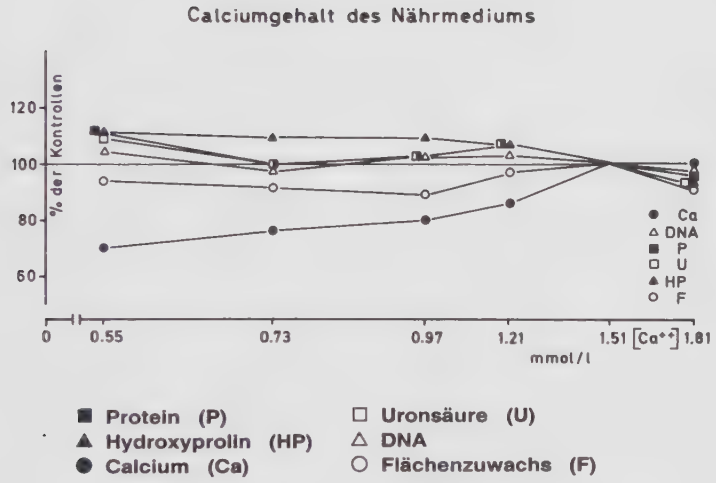


Abb. 10: Einfluß einer modifizierten Calciumkonzentration des Nährmediums auf sechs Tage in vitro kultivierte Tibiaanlagen. (Gehalt bzw. Flächenzuwachs in % der Kontrollen)

Tab.4: Einfluß einer modifizierten Calciumkonzentration des Nährmediums (0,55 - 1,81 mmol/l) auf den Gesamtprotein- (Protein), DNA-Gehalt (/ug/Tibia) und auf den prozentualen Flächenzuwachs kultivierter Tibiaexplantate. (P = Ø = nicht signifikant)

		0,55	0,73	0,97	1,21	Kontrolle 1,51	1,81 mmol/l
Protein (n=18)	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	219,1±15,69	189,7±6,71	198,4±11,14	202,7±4,89	192,6±8,14	185,7±10,35
	%	113,74	98,50	103,01	105,25	100	96,41
	P	0,05	Ø	Ø	Ø		Ø
DNA (n=18)	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	8,41±0,33	7,89±0,31	8,29±0,58	8,37±0,29	8,09±0,40	7,89±0,41
	%	103,93	97,52	102,38	103,36	100	97,48
	P	Ø	Ø	Ø	Ø		Ø
Fläche (n=36)	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	44,88±3,80	43,41±4,12	42,44±2,92	46,48±3,16	47,55±4,02	43,42±3,56
	%	94,38	91,29	89,24	97,73	100	91,30
	P	Ø	Ø	Ø	Ø		Ø

Tab.5: Einfluß einer modifizierten Calciumkonzentration des Nährmediums (0,55 - 1,81 mmol/l) auf den Hydroxyprolin- (HP), Uronsäure- und Calciumgehalt (/ug/Tibia) kultivierter Tibiaexplantate. (P = Ø = nicht signifikant)

		0,55	0,73	0,97	1,21	Kontrolle 1,51	1,81 mmol/l
HP	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	9,18±0,45	8,99±0,47	9,01±0,53	8,73±0,38	8,26±0,44	7,70±0,60
	%	111,09	108,74	109,03	105,71	100	93,22
(n=18)	P	Ø	Ø	Ø	Ø		Ø
Uron-	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	33,42±2,28	30,30±2,19	31,14±2,40	32,57±2,48	30,44±2,08	29,31±1,87
säure	%	109,76	99,54	102,27	106,99	100	96,26
(n=18)	P	Ø	Ø	Ø	Ø		Ø
Cal-	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	35,38±3,83	38,36±3,08	40,47±3,91	43,62±4,78	50,56±4,37	50,64±5,18
cium	%	69,98	75,87	80,04	86,29	100	100,18
(n=18)	P	0,001	0,01	Ø	Ø		Ø

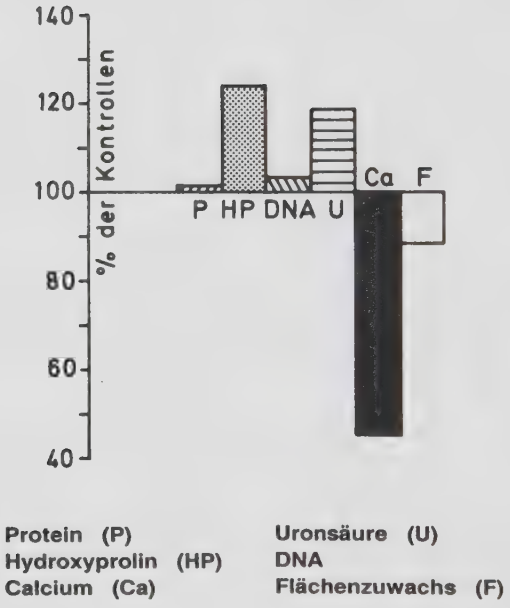


Abb. 11: Einfluß einer auf 0,1 mmol/l erniedrigten Calciumkonzentration des Nährmediums auf sechs Tage in vitro kultivierte Tibiaanlagen. (Gehalt bzw. Flächenzuwachs in % der Kontrollen)

Tab.6: Protein- (P), DNA-, Hydroxyprolin- (HP), Uronsäure- (U), Calciumgehalt (Ca) (in µg/Tibia) und Wachstum (F) (in % Flächenzuwachs) fetaler Tibiae nach Inkubation in einem Medium mit 0,10 bzw. 1,51 mmol/l Calcium.

	Ca^{++}: 1,51 (Kontrolle)	Ca^{++}: 0,10	% der Kontrolle	p(n=18)
P	186,08± 9,34	188,91± 7,50	101,52	Ø
DNA	8,08± 0,37	8,34± 0,41	103,22	Ø
HP	5,28± 0,24	6,59± 0,28	124,81	0,001
U	29,58± 1,76	35,06± 2,06	118,53	0,01
Ca	63,89± 1,84	29,18± 2,00	45,67	0,001
F	34,99± 4,99	30,93± 5,06	88,40	Ø

4.5. Pharmakaeinflüsse auf die Tibiakulturen

4.5.1. Natriumfluorid

Die Wirkungen des Natriumfluorids wurden über einen weiten Konzentrationsbereich untersucht. Dieser reichte von der normalen Plasmakonzentration (ca. 0,001 mmol/l) über den therapeutischen Plasmaspiegel bei der Osteoporosetherapie (ca.0,005-0,01mmol/l) bis hin zu toxischen Konzentrationen (2 mmol/l). Beim Vergleich der Konzentrationen der vorliegenden Versuche mit den genannten Plasmaspiegeln muß natürlich berücksichtigt werden, daß es sich um ein isoliertes Organ in vitro handelt und die Expositionsdauer nur sechs Tage beträgt. Es ist kaum zu erwarten, daß Dosierungen, die in vivo erst bei einer Dauertherapie über Jahre zu einer therapeutischen Wirkung führen, während einer vergleichsweise kurzen Inkubationsdauer in vitro einen Effekt zeigen.
Wie aus Abb.11 und Tab.9 hervorgeht, verursachte NaF einen kon-

zentrationsabhängigen Anstieg des Calciumgehaltes der Explantate, welcher allerdings erst bei 0,5 mmol/l signifikant ist. Interessanterweise setzt sich diese Tendenz auch noch bis zur Konzentration von 2 mmol/l fort, bei der bereits das Wachstum und die übrigen Parameter sehr deutlich beeinträchtigt sind (Tab.7-9). Neben dem gesteigerten Calciumeinbau in die Explantate wird keine der bestimmten Größen bis einschließlich 0,5 mmol Fluorid/l signifikant beeinflußt. Wachstum, Protein-, DNA- und Kollagengehalt lassen im Konzentrationsbereich zwischen 0,001 und 0,5 mmol Fluorid/l lediglich eine Tendenz zu reduzierten Werten erkennen, während der Uronsäuregehalt teilweise leicht aber statistisch nicht signifikant erhöht war. Die Reduktion der erfaßten Parameter mit Ausnahme des Calciumgehaltes unter einer Inkubation mit 2 mmol Fluorid/l dürfte Folge toxischer Fluorideffekte sein, die ab dieser Konzentration zum Tragen kommen.

Natriumfluorid:
Gleichung der Regressionsgeraden, Korrelationskoeffizienten und Irrtumswahrscheinlichkeiten der Korrelationskoeffizienten

		y=	r	p<
Protein	(0 - 2 mmol/l)	-46,594x +212,25	-0,9702	0,001
DNA	(0 - 2 mmol/l)	- 1,911x + 8,68	-0,9713	0,001
Fläche	(0 - 2 mmol/l)	-14,940x + 38,43	-0,9541	0,001
HP	(0 - 2 mmol/l)	- 3,254x + 10,08	-0,9704	0,001
Urons.	(0 - 2 mmol/l)	- 6,906x + 30,82	-0,9070	0,001
Ca	(0 - 2 mmol/l)	11,110x + 55,67	0,8856	0,001

Tab.7: Einfluß von Natriumfluorid (0,001 - 2 mmol/l) auf den Gesamtprotein- (Protein) und DNA-Gehalt (/ug/Tibia) kultivierter Tibiaexplantate. (P = Ø = nicht signifikant)

Protein	$\bar{x} \pm 2s_{\bar{x}}$	%	P (n=18)
Kontrolle	222,2±12,17	100	
0,001	201,5±13,63	90,68	Ø
0,002	208,3±18,50	93,75	Ø
0,005	211,6±18,39	95,20	Ø
0,01	200,6±16,42	90,28	Ø
0,02	222,0±11,96	99,90	Ø
0,1	210,2±16,79	94,57	Ø
0,5	192,4±15,47	86,58	Ø
2	115,9±8,61	52,14	0,001
DNA			
Kontrolle	9,16±0,77	100	
0,001	8,56±0,67	93,52	Ø
0,002	8,96±0,69	97,91	Ø
0,005	8,27±0,91	90,28	Ø
0,01	8,62±0,75	94,16	Ø
0,02	8,31±1,06	90,79	Ø
0,1	8,35±0,97	91,19	Ø
0,5	8,10±0,96	88,49	Ø
2	4,78±0,70	52,18	0,001

Tab.8: Einfluß von Natriumfluorid (0,001 - 2 mmol/l) auf den Hydroxyprolin- (HP) und Uronsäuregehalt (/ug/Tibia) kultivierter Tibiaexplantate. (P = Ø = nicht signifikant)

HP	$\bar{x} \pm 2s_{\bar{x}}$	%	P (n=18)
Kontrolle	10,64±1,27	100	
0,001	9,64±2,02	90,60	Ø
0,002	9,52±1,28	89,43	Ø
0,005	10,24±1,49	96,23	Ø
0,01	9,73±1,71	91,45	Ø
0,02	10,53±1,74	98,97	Ø
0,1	9,63±1,45	90,52	Ø
0,5	8,74±1,26	82,15	Ø
2	5,11±0,78	48,01	0,001
Uronsäure			
Kontrolle	28,61±1,22	100	
0,001	27,45±1,69	95,96	Ø
0,002	32,20±2,53	112,55	Ø
0,005	32,23±1,91	112,65	Ø
0,01	28,53±2,37	99,72	Ø
0,02	33,08±2,11	115,62	Ø
0,1	32,08±2,07	112,12	Ø
0,5	28,37±1,79	99,18	Ø
2	16,65±1,85	58,19	0,001

Tab.9: Einfluß von Natriumfluorid (0,001 - 2 mmol/l) auf den Calciumgehalt (/ug/Tibia) und den prozentualen Flächenzuwachs kultivierter Tibiaexplantate. (P = Ø = nicht signifikant)

Calcium	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	%	P (n=18)
Kontrolle	53,60±4,42	100	
0,001	51,20±2,95	95,52	Ø
0,002	53,22±3,31	99,30	Ø
0,005	54,56±4,05	101,78	Ø
0,01	55,78±4,20	104,06	Ø
0,02	57,00±3,91	106,34	Ø
0,1	59,64±3,53	111,28	Ø
0,5	69,71±5,28	130,06	0,001
2	75,62±3,33	141,09	0,001

Fläche			P (n=36)
Kontrolle	41,71±3,97	100	
0,001	37,40±4,21	89,67	Ø
0,002	36,64±4,44	87,86	Ø
0,005	36,79±4,20	88,21	Ø
0,01	35,11±3,49	84,19	Ø
0,02	37,41±3,03	89,70	Ø
0,1	36,70±4,08	87,99	Ø
0,5	37,74±5,16	90,50	Ø
2	6,90±4,05	16,55	0,001

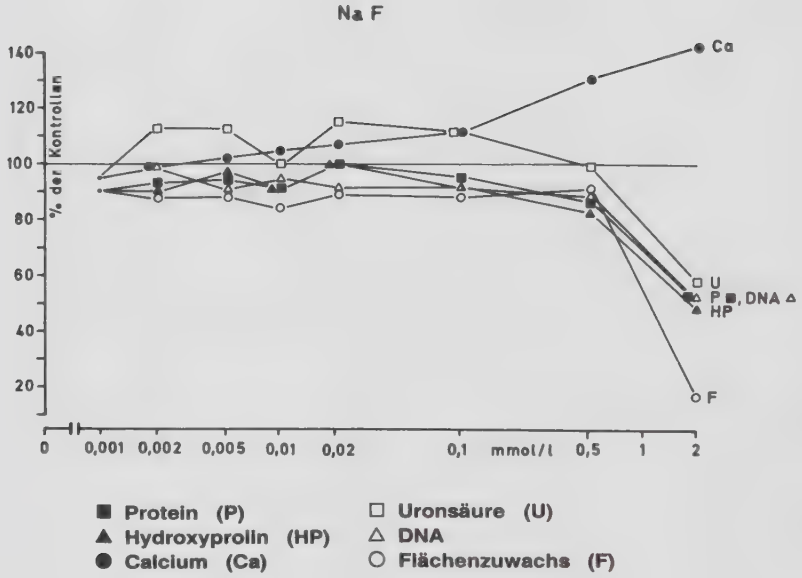
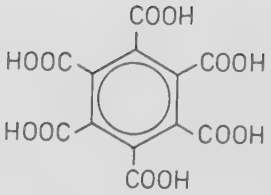


Abb.12 : Einfluß von Natriumfluorid (0,001 - 2 mmol/l) auf sechs Tage in vitro kultivierte Tibiaanlagen. (Gehalt bzw. Flächenzuwachs in % der Kontrollen)

4.5.2. Mellitsäure

4.5.2.1. Einfluß von Mellitsäure auf die Tibiakulturen

Nachdem Vorversuche mit der Mellitsäure bis zu einer Konzentration von 5 mmol/l noch keine deutliche Hemmwirkung auf das Wachstum der Tibiae gezeigt hatten, wurde der untersuchte Konzentrationsbereich bis auf 15 mmol/l erweitert, weil die Untersuchungen auch bei dieser Verbindung potentiell toxische Konzentrationen einschließen sollten. Die mit Mellitsäure erzielten Ergebnisse sind in Abb.13 und Tab.10 und 11 dargestellt.
Protein- und DNA- Gehalt der Explantate blieben bis 10 mmol/l unbeeinflußt und zeigten unter 15 mmol/l eine Reduktion, was Ausdruck einer unspezifisch toxischen Wirkung sein dürfte. Der Kollagengehalt fiel nach leichter, aber nicht signifikanter Erhöhung bei niedrigen Konzentrationen wieder auf das Kontrollniveau ab. Mit Anheben der Konzentration auf 10 bzw. 15 mmol/l trat, wie auch die Korrelationsanalyse erkennen läßt, eine Tendenz zu einer Hemmung der Kollagensynthese zutage. Beim direkten Vergleich mit den zugehörigen Kontrollen waren die Differenzen jedoch auch bei der Konzentration von 15 mmol/l noch nicht statistisch signifikant.
Von diesen geringgradigen Effekten heben sich die Mellitsäurewirkungen auf die drei übrigen Meßgrößen deutlich ab. Dosisabhängig kam es durch die Mellitsäure zur Steigerung der Glykosaminoglykansynthese. Das Maximum dieser Wirkung trat in den vorliegenden Versuchen bei 10 mmol/l auf. Parallel hiermit ging ein gesteigertes Flächenwachstum der Explantate. Aus den in Abb.14 gezeigten Fotos der Tibiae, sowie aus dem Zusammenhang zwischen Flächenzuwachs und Uronsäuregehalt ist ersichtlich, daß sich die Wirkung der Mellitsäure bevorzugt auf die knorpeligen Epiphysen erstreckte.
Auf den Calciumeinbau in die Explantate übte die Mellitsäure eine deutliche Hemmwirkung aus. Bereits ab 0,2 mmol/l konnte dieser Effekt festgestellt werden (Vorversuche). Ab 2 mmol/l sind die Unterschiede zu den Kontrollen statistisch signifikant. Offen-



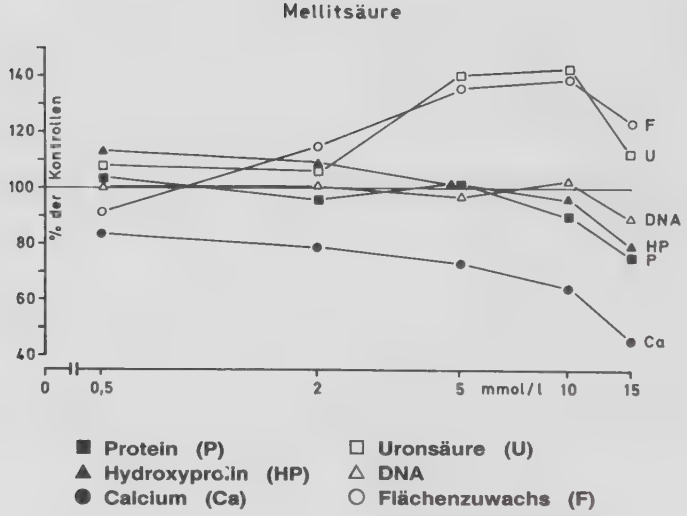


Abb. 13: Einfluß von Mellitsäure (0,5 - 15 mmol/l) auf sechs Tage in vitro kultivierte Tibiaanlagen. (Gehalt bzw. Flächenzuwachs in % der Kontrollen)

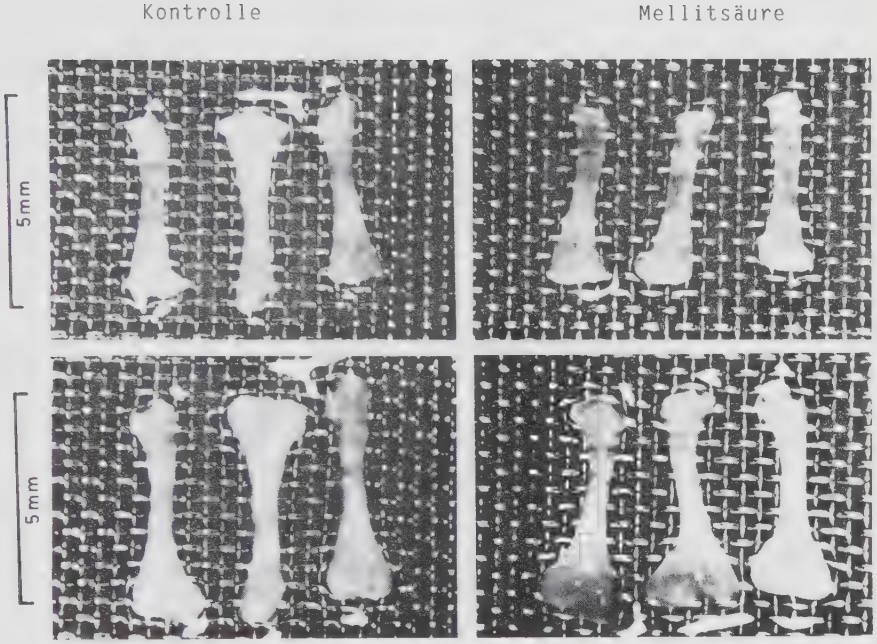


Abb. 14: Einfluß von Mellitsäure (10 mmol/l) auf sechs Tage in vitro inkubierte Tibiaanlagen.
Oben: Tibiae auf Edelstahlnetz vor Inkubation
Unten: Nach Inkubation.

Tab.10: Einfluß von Mellitsäure (0,5 - 15 mmol/l) auf den Gesamtprotein- (Protein), DNA-Gehalt (µg/Tibia) und auf den prozentualen Flächenzuwachs kultivierter Tibiaexplantate. (P = Ø = nicht signifikant)

		Kontrolle	0,5	2	5	10	15 mmol/l
Protein (n=18)	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	228,4±20,98	236,3±17,21	217,6±19,89	229,1±19,32	204,7±32,02	173,2±14,33
	%	100	103,45	95,29	100,32	89,62	75,83
	P		Ø	Ø	Ø	Ø	0,05
DNA (n=18)	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	6,75±0,69	6,77±0,71	6,81±0,66	6,50±0,74	6,88±0,96	5,97±0,78
	%	100	100,28	100,90	96,37	101,96	88,46
	P		Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Fläche (n=36)	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	51,97±4,03	47,33±4,67	59,53±4,25	70,23±5,77	71,74±5,51	63,64±6,64
	%	100	91,06	114,54	135,13	138,03	122,44
	P		Ø	Ø	0,001	0,001	Ø

Tab.11: Einfluß von Mellitsäure (0,5 - 15 mmol/l) auf den Hydroxyprolin- (HP), Uronsäure- und Calciumgehalt (/ug/Tibia) kultivierter Tibiaexplantate. (P = Ø = nicht signifikant)

		Kontrolle	0,5	2	5	10	15 mmol/l
HP	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	7,51±0,80	8,50±0,78	8,10±0,76	7,57±0,65	7,15±0,82	5,89±0,40
	%	100	113,31	107,91	100,88	95,30	78,52
(n=18)	P		Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Uron-	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	37,80±3,81	40,50±3,24	39,88±3,41	52,75±5,69	53,59±4,46	42,06±5,44
säure	%	100	107,15	105,51	139,56	141,79	111,27
(n=18)	P		Ø	Ø	0,001	0,001	Ø
Cal-	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	52,31±3,39	43,58±3,39	41,09±3,45	38,22±3,37	33,49±5,62	23,60±4,35
cium	%	100	83,31	78,55	73,07	64,02	45,11
(n=18)	P		Ø	0,05	0,001	0,001	0,001

sichtlich hemmten die hohen Konzentrationen nicht nur den Calciumeinbau, sondern bedingten auch eine Abgabe des Minerals aus den Knochen in das Nährmedium. Denn unter der Annahme, daß die Kontrollgruppe einen durchschnittlichen Calciumzuwachs von 56% aufweist (s.Tab.3), müßte der Calciumgehalt von Explantaten ohne Zuwachs nach Inkubation bei ca. 64% der Kontrollen liegen. Folglich spricht der Wert von 45,11% bei 15 mmol/l Mellitsäure für einen ausgeprägten Calciumverlust.

Mellitsäure:
Gleichung der Regressionsgeraden, Korrelationskoeffizienten und Irrtumswharscheinlichkeiten der Korrelationskoeffizienten

		y=		r	p<
Protein	(0 - 15 mmol/l)	-3,5905x	+234,33	-0,9238	0,001
DNA	(0 - 15 mmol/l)	-0,0397x	+ 6,83	-0,6964	0,001
Fläche	(0 - 10 mmol/l)	2,3305x	+ 52,00	0,8887	0,001
HP	(0 - 15 mmol/l)	-0,1351x	+ 8,18	-0,8946	0,001
Urons.	(0 - 10 mmol/l)	1,6741x	+ 39,04	0,9061	0,001
Ca	(0 - 15 mmol/l)	-1,5390x	+ 47,05	-0,9475	0,001

4.5.2.2. Einfluß von Mellitsäure auf das ionisierte Calcium im Nährmedium

Um eine eventuelle Beeinflussung des ionisierten Anteils des Calciums im Nährmedium durch die Mellitsäure festzustellen, wurde mittels einer ionenselektiven Elektrode das ionisierte Calcium im Nährmedium bestimmt. Durch Parallelmessung des Gesamtcalciums im selben Medium konnte auf den gebundenen Anteil geschlossen werden. Das benutzte Pferdeserum hatte einen Gesamtcalciumgehalt von 2,64 mmol/l mit einem ionisierten Anteil von 56,82%. Das gesamte Calcium im Kontrollmedium mit 15% Serumzusatz lag als

ungebundenes Calcium vor (s.Tab.12).

Tab.12: Calciumionisation unter Einfluß von Mellitsäure

Mellitsäure mmol/l	Gesamtcalcium mmol/l	freies Calcium mmol/l	ionisierter Anteil %
0	1,47	1,47	100
0,5	1,47	1,11	75,52
2	1,47	0,61	41,26
5	1,47	0,30	20,28
10	1,41*	0,15	10,49
15	1,33*	0,10	6,99

*= Präzipitation

Aus den in Tab.12 zusammengefaßten Meßwerten geht eindeutig hervor, daß Mellitsäure eine Reduzierung des ionisierten Calciumanteils verursacht. Hierzu ist keine Ausfällung von Calciummellitat erforderlich, die im übrigen erst ab 10 mmol/l eintrat, sondern offensichtlich ist eine Komplexbildung Ursache dieses Effektes. Da für physiologische Vorgänge das Calcium in der ungebundenen Form vorliegen muß, wurde der Einfluß der Mellitsäure auf den Calciumeinbau in die Explantate zur Konzentration des ionisierten Calciums in Beziehung gesetzt (Abb.15 a,b). Die Regressionsgerade und der Korrelationskoeffizient deuten auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen Erniedrigung des ionisierten Calciums im Medium und gehemmtem Einbau in die Explantate hin.

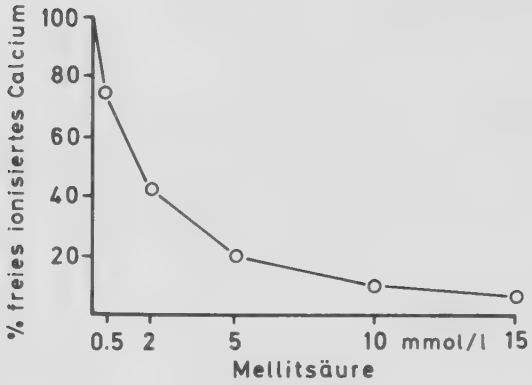


Abb. 15(a): Einfluß von Mellitsäure auf den Anteil des ionisierten Calciums im Nährmedium. (100 % = 1,47 mmol/l)

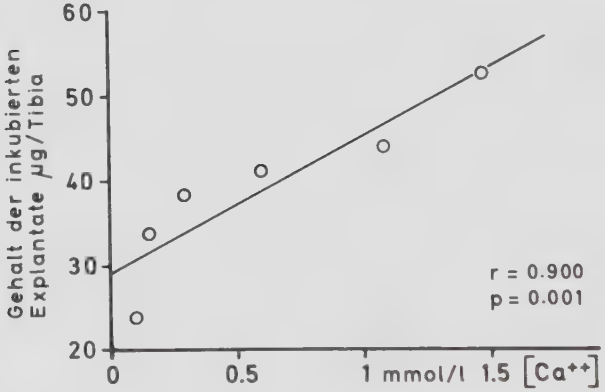


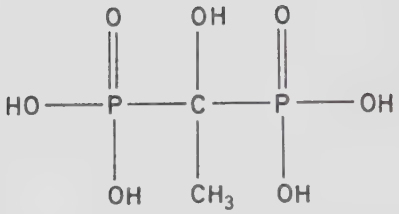
Abb. 15(b): Zusammenhang zwischen ionisiertem Calcium des Nährmediums (Abszisse) und Calciumgehalt der Explantate (Ordinate). Die Veränderung der Konzentration des ionisierten Calciums ist durch die Zugabe der Mellitsäure bewirkt worden (s.Abb.15a).

4.5.3. 1-Hydroxyethyliden-1,1-bisphosphonat (HEBP)

HEBP (Abb.16, Tab.13-15) senkte dosisabhängig den Calciumeinbau in die Explantate. Diese Wirkung trat bereits bei Konzentrationen auf, die keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die übrigen Parameter hatten. Erst Konzentrationen von 3,33 und 5 mmol/l verminderten den Flächenzuwachs der Explantate bzw. den Protein-, Hydroxyprolin- und Uronsäuregehalt. Der DNA-Gehalt der Tibiae wurde durch das HEBP in Konzentrationen von 1,33 und 3,33 mmol/l signifikant erhöht. Unter Einfluß von 5 mmol HEBP/l stiegen die DNA-Werte nicht weiter an; sie lagen zwar nur noch um ca. 17% über den Kontrollwerten, was aber im deutlichen Gegensatz zum stark reduzierten Flächenzuwachs steht.

HEBP:
Gleichung der Regressionsgeraden, Korrelationskoeffizienten und Irrtumswahrscheinlichkeiten der Korrelationskoeffizienten

		y=	r	p
Protein	(0 - 5 mmol/l)	-16,330x +220,91	-0,9602	0,001
DNA	(0 - 3,33 mmol/l)	1,112x + 5,95	0,9484	0,001
Fläche	(0 - 5 mmol/l)	- 4,739x + 46,75	-0,9366	0,001
HP	(0 - 5 mmol/l)	- 0,459x + 8,50	-0,8947	0,001
Urons.	(0 - 5 mmol/l)	- 2,280x + 32,82	-0,8886	0,001
Ca	(0 - 5 mmol/l)	- 4,689x + 53,90	-0,9697	0.001



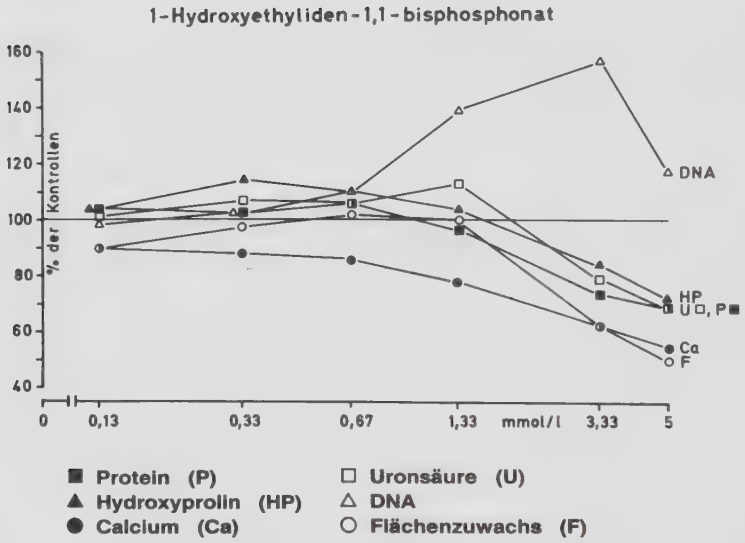


Abb. 16: Einfluß von 1-Hydroxyethyliden-1,1-bisphosphonat (HEBP, 0,13 - 5 mmol/l) auf sechs Tage in vitro kultivierte Tibiaanlagen. (Gehalt bzw. Flächenzuwachs in % der Kontrollen)

Tab.13: Einfluß von 1-Hydroxy-ethyliden-1,1-bisphosphonat (0,13 - 5 mmol/l) auf den Gesamtprotein- (Protein), und DNA-Gehalt (/ug/Tibia) kultivierter Tibiaexplantate. (P = Ø = nicht signifikant)

Protein	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	%	P (n=18)
Kontrolle	210,7±18,86	100	
0,13	217,9±15,31	103,45	Ø
0,33	216,3±14,98	102,69	Ø
0,67	223,1±16,68	105,88	Ø
1,33	203,6±13,83	96,65	Ø
3,33	153,7±21,46	72,97	0,005
5	144,8±12,91	68,72	0,001
DNA			
Kontrolle	6,01±0,69	100	
0,13	5,91±0,59	98,39	Ø
0,33	6,06±0,50	100,93	Ø
0,67	6,43±0,82	106,99	Ø
1,33	8,34±0,97	138,80	0,01
3,33	9,37±1,06	155,94	0,001
5	7,01±0,57	116,74	Ø

Tab.14: Einfluß von 1-Hydroxy-ethyliden-1,1-bisphosphonat (0,13 - 5 mmol/l) auf den Hydroxyprolin- (HP) und den Uronsäuregehalt (µg/Tibia) kultivierter Tibiaexplantate. (P = Ø = nicht signifikant)

HP	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	%	P (n=18)
Kontrolle	7,84±0,71	100	
0,13	8,26±0,63	105,41	Ø
0,33	8,94±0,82	114,10	Ø
0,67	8,52±0,56	108,76	Ø
1,33	8,06±0,51	102,85	Ø
3,33	6,56±0,56	83,69	Ø
5	6,35±0,42	80,99	Ø
Uronsäure			
Kontrolle	30,58±2,87	100	Ø
0,13	31,01±1,84	101,38	Ø
0,33	32,36±1,68	105,81	Ø
0,67	31,88±2,16	104,25	Ø
1,33	34,35±2,70	112,32	Ø
3,33	24,03±1,54	78,56	0,005
5	20,95±1,23	68,49	0,001

Tab.15: Einfluß von 1-Hydroxy-ethyliden-1,1-bisphosphonat (0,13 - 5 mmol/l) auf den Calciumgehalt (/ug/Tibia) und den prozentualen Flächenzuwachs kultivierter Tibiaexplantate. (P = Ø = nicht signifikant)

Calcium	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	%	P (n=18)
Kontrolle	58,31±3,86	100	
0,13	52,69±4,02	90,36	Ø
0,33	51,13±3,21	87,69	Ø
0,67	50,00±2,73	85,75	0,05
1,33	45,44±3,17	77,93	0,001
3,33	37,16±2,59	63,72	0,001
5	32,00±2,84	54,88	0,001

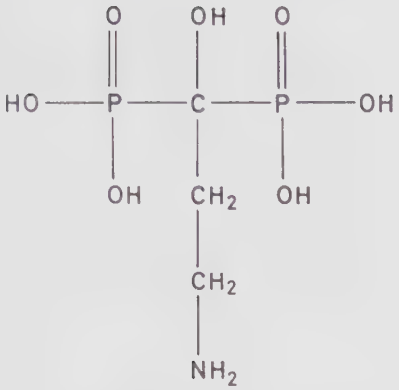
Fläche			P (n=36)
Kontrolle	46,03±4,80	100	
0,13	41,28±4,07	89,68	Ø
0,33	44,71±3,48	97,13	Ø
0,67	46,79±3,93	101,65	Ø
1,33	45,75±4,52	99,40	Ø
3,33	28,57±3,82	62,07	0,001
5	22,96±5,69	49,87	0,001

4.5.4. 3-Amino-1-hydroxypropyliden-1,1-bisphosphonat (AHPrBP)

Die mit AHPrBP erhobenen Befunde sind in Abb.17 und Tab.16, 17 dargestellt. Der Calciumgehalt der Tibiae war bereits bei 0,2 mmol/l AHPrBP signifikant erniedrigt. Mit steigender Konzentration nahm diese Wirkung, wenn auch geringfügig, zu. Flächenwachstum, Uronsäure-, Protein- und Hydroxyprolingehalt blieben bis 2 mmol/l unverändert, fielen dann allerdings bei 5 mmol/l stark ab. Der DNA-Gehalt der Explantate nahm dosisabhängig zu. Bei 2 bzw. 5 mmol/l sind die Werte hoch signifikant von den Kontrollen verschieden. Interessanterweise führte die höchste Konzentration des AHPrBP zur fast vollständigen Hemmung des Größenzuwachses der Explantate, ohne deren DNA-Gehalt zu vermindern.

AHPrBP:
Gleichung der Regressionsgeraden, Korrelationskoeffizienten und Irrtumswahrscheinlichkeiten der Korrelationskoeffizienten

		y=	r	p
Protein	(0 - 5 mmol/l)	-21,570x +249,55	-0,9054	0,001
DNA	(0 - 5 mmol/l)	0,617x + 7,89	0,8922	0,001
Fläche	(0 - 5 mmol/l)	- 5,205x + 49,38	-0,8443	0,001
HP	(0 - 5 mmol/l)	- 0,933x + 9,59	-0,9449	0,001
Urons.	(0 - 5 mmol/l)	- 1,970x + 39,73	-0,8892	0,001
Ca	(0 - 5 mmol/l)	- 3,011x + 45,87	-0,7760	0,001



3-Amino-1-hydroxypropyliden-1,1-bisphosphonat

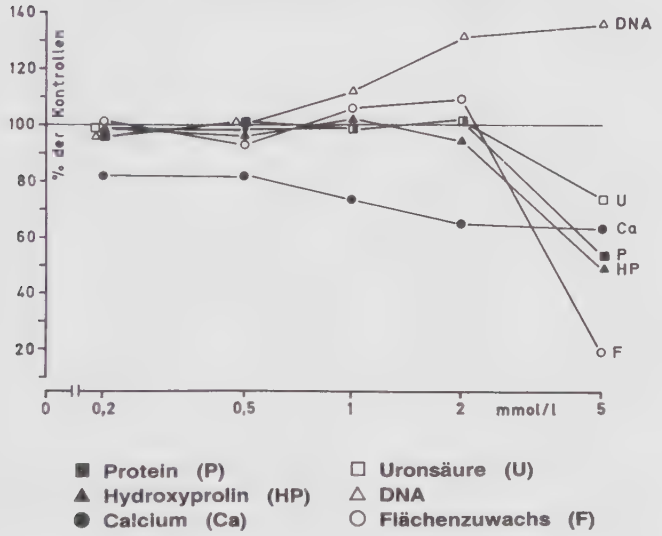


Abb. 17: Einfluß von 3-Amino-1-hydroxypropyliden-1,1-bisphosphonat (AHPrBP, 0,2 - 5 mmol/l) auf sechs Tage in vitro kultivierte Tibiaanlagen. (Gehalt bzw. Flächenzuwachs in % der Kontrollen)

Tab.16: Einfluß von 3-Amino-1-hydroxypropyliden-1,1-bisphosphonat (0,2 - 5 mmol/l) auf den Gesamtprotein- (Protein), DNA-Gehalt und auf den prozentualen Flächenzuwachs kultivierter Tibiaexplantate. (P = Ø = nicht signifikant) (/ug/Tibia)

		Kontrolle	0,2	0,5	1	2	5 mmol/l
Protein (n=18)	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	238,7±15,80	229,2±15,27	239,7±12,47	233,9±14,40	240,9±11,64	127,3±11,10
	%	100	96,02	100,43	97,99	100,93	53,33
	P		Ø	Ø	Ø	Ø	0,001
DNA (n=18)	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	7,81±0,53	7,53±0,63	7,90±0,48	8,70±0,65	10,21±0,62	10,55±0,75
	%	100	96,48	101,21	111,43	130,82	135,12
	P		Ø	Ø	Ø	0,001	0,001
Fläche (n=36)	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	45,64±3,69	46,22±2,97	42,35±3,53	48,25±3,95	49,78±4,56	8,55±2,31
	%	100	101,27	92,80	105,72	109,06	18,74
	P		Ø	Ø	Ø	Ø	0,001

Tab.17: Einfluß von 3-Amino-1-hydroxypropyliden-1,1-bisphosphonat (0,2 - 5 mmol/l) auf den Hydroxyprolin- (HP), Uronsäure- und Calciumgehalt kultivierter Tibiaexplantate. (P = Ø = nicht signifikant) (/ug/Tibia)

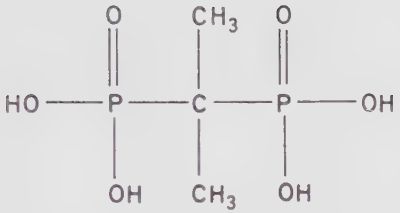
		Kontrolle	0,2	0,5	1	2	5 mmol/l
HP	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	9,14±0,58	9,12±0,74	8,77±0,53	9,26±0,56	8,66±0,40	4,48±0,40
	%	100	99,82	96,0	101,40	94,82	49,08
(n=18)	P		Ø	Ø	Ø	Ø	0,001
Uron-	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	38,96±3,33	38,13±3,45	37,82±2,68	38,52±2,42	39,34±2,96	28,44±2,43
säure	%	100	97,86	97,07	98,86	100,97	72,99
(n=18)	P		Ø	Ø	Ø	Ø	0,001
Cal-	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	53,49±4,15	43,80±3,42	43,80±3,01	39,56±2,72	34,71±2,82	33,64±3,06
cium	%	100	81,89	81,89	73,95	64,89	62,90
(n=18)	P		0,005	0,005	0,001	0,001	0,001

4.5.5. Propyliden-2,2-bisphosphonat (PrBP)

Aus den in Abb.18 und Tab.18 u. 19 zusammengefaßten Ergebnissen geht hervor, daß PrBP die Calciumeinlagerung in die Explantate bereits bei 0,2 mmol/l stark hemmte; der Unterschied zu den Kontrollen war hoch signifikant. Mit weiterer Dosiserhöhung verstärkte sich dieser Effekt allerdings nur noch wenig; bei 5 mmol/l betrug der Calciumgehalt 67,1 % der Kontrollen.
Ein ähnliches Verhalten zeigte das Wachstum der Tibiae. Alle geprüften Konzentrationen hemmten das Flächenwachstum, doch mit steigender Konzentration war keine Verstärkung dieses Effektes zu sehen. Der Protein- und Hydroxyprolingehalt wurden dosisabhängig vermindert. Während der Uronsäuregehalt bei keiner Konzentration signifikante Veränderungen erkennen ließ, veränderte sich der DNA-Gehalt nicht eindeutig konzentrationsabhängig. Nach signifikanter Verminderung bei niedrigen Konzentrationen (0,5 - 1 mmol/l), stieg er bei den höheren Konzentrationen wieder leicht an, ohne jedoch das Kontrollniveau zu erreichen.

PrBP:
Gleichung der Regressionsgeraden, Korrelationskoeffizienten und Irrtumswahrscheinlichkeiten der Korrelationskoeffizienten

		y=	r	p
Protein	(0 - 5 mmol/l)	-13,030x +230,02	-0,9003	0,001
DNA	(0 - 5 mmol/l)	- 0,178x + 8,39	-0,4046	Ø
Fläche	(0 - 5 mmol/l)	- 2,178x + 40,71	-0,5827	0,005
HP	(0 - 5 mmol/l)	- 0,984x + 11,00	-0,9503	0,001
Urons.	(0 - 5 mmol/l)	- 0,690x + 30,80	-0,7979	0,001
Ca	(0 - 5 mmol/l)	- 2,313x + 52,23	-0,5900	0,005



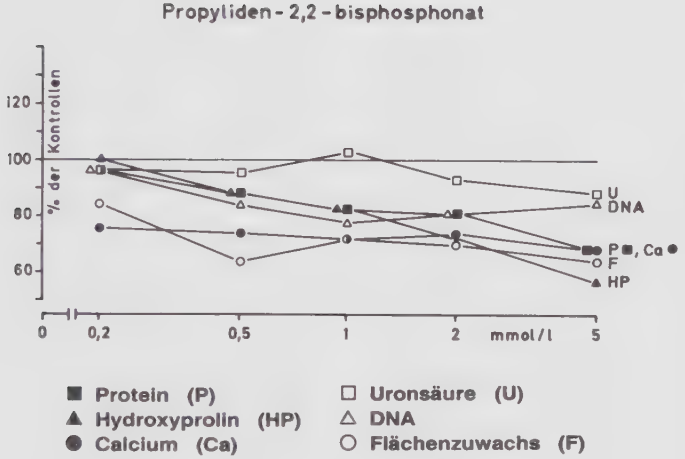


Abb. 18: Einfluß von Propyliden-2,2-bisphosphonat (PrBP, 0,2 - 5 mmol/l) auf sechs Tage in vitro kultivierte Tibiaanlagen. (Gehalt bzw. Flächenzuwachs in % der Kontrollen)

Tab.18: Einfluß von Propyliden-2,2-bisphosphonat (0,2 - 5 mmol/l) auf den Gesamtprotein- (Protein), DNA-Gehalt und auf den prozentualen Flächenzuwachs kultivierter Tibiaexplantate. (P = Ø = nicht signifikant) (/ug/Tibia)

		Kontrolle	0,2	0,5	1	2	5 mmol/l
Protein (n=18)	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	246,0±15,67	235,7±11,80	214,2±11,61	202,7±12,10	197,1±10,93	171,1±12,22
	%	100	95,81	87,06	82,37	80,12	69,55
	P		Ø	0,05	0,001	0,001	0,001
DNA (n=18)	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	9,38±0,55	8,86±0,57	7,88±0,62	7,23±0,56	7,49±0,50	7,93±0,82
	%	100	94,48	84,08	77,06	79,86	84,53
	P		Ø	0,05	0,001	0,005	Ø
Fläche (n=36)	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	49,73±5,14	41,79±3,44	31,57±2,93	35,67±2,76	34,76±3,51	31,77±3,61
	%	100	84,04	63,47	71,72	69,89	63,89
	P		Ø	0,001	0,001	0,001	0,001

Tab.19: Einfluß von Propyliden-2,2-bisphosphonat (0,2 - 5 mmol/l) auf den Hydroxyprolin- (HP), Uronsäure- und Calciumgehalt kultivierter Tibiaexplantate. (P = Ø = nicht signifikant) (/ug/Tibia)

		Kontrolle	0,2	0,5	1	2	5 mmol/l
HP	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	11,50±0,95	11,48±0,95	10,30±0,78	9,31±0,69	8,38±0,59	6,48±0,67
	%	100	99,82	89,56	80,92	72,86	56,34
(n=18)	P		Ø	Ø	0,05	0,001	0,001
Uron-	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	31,12±1,84	29,93±1,65	29,65±1,64	31,90±2,11	28,86±1,70	27,32±1,14
säure	%	100	96,17	95,29	102,5	92,75	87,79
(n=18)	P		Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Cal-	$\bar{x}\pm 2s_{\bar{x}}$	63,42±3,46	47,91±3,46	47,42±3,36	45,64±3,29	46,31±4,61	42,56±3,24
cium	%	100	75,54	74,77	71,97	73,02	67,10
(n=18)	P		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

4.6. Einfluß der Bisphosphonate auf das ionisierte Calcium im Nährmedium

Im Hinblick auf die calciumkomplexierenden Eigenschaften der Bisphosphonate, wurde deren Einfluß auf die Calciumionisation des Mediums gemessen (Tab.20, Abb.19 u. 20). HEBP und AHPrBP senkten sehr stark die Konzentration des ionisierten Calciums. Bereits ein Zusatz von etwa 1 mmol/l reduzierte den ionisierten Anteil auf weniger als 50 % des Ausgangswertes. Bei den höchsten Konzentrationen lag nahezu das gesamte Calcium in gebundener Form vor. Das AHPrBP bildete schwerlösliche Komplexe mit Calcium, die bei allen geprüften Konzentrationen zu Präzipitaten führten. Dies konnte durch Zentrifugation des Mediums und Calciumbestimmung im Überstand belegt werden. Das PrBP hatte einen deutlich geringeren Effekt auf die Ionisation des Calciums. Erst oberhalb 2 mmol/l wurden 50 % des Calciums gebunden. Trotz Erhöhung der Konzentration auf 5 mmol/l blieben 30 % des Calciums in der freien Form vorhanden.

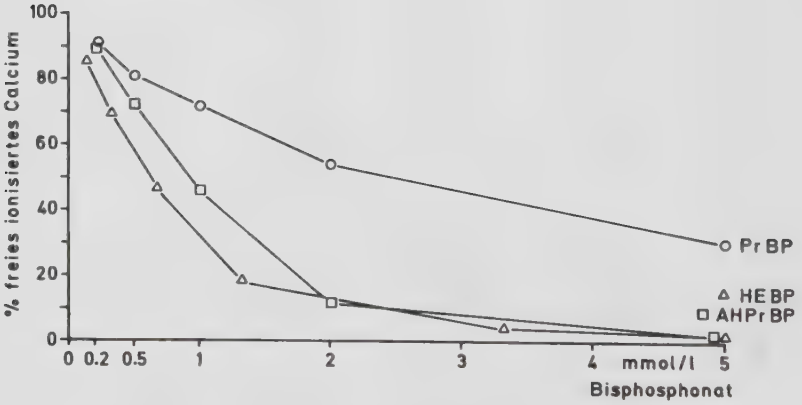


Abb. 19: Einfluß von Bisphosphonaten auf den Anteil des ionisierten Calciums im Nährmedium. (100% = 1,50 mmol/l)

Tab. 20: Calciumionisation unter Einfluß von Bisphosphonaten

HEBP mmol/l	Gesamtcalcium mmol/l	freies Calcium mmol/l	ionisierter Anteil %
0 (Kontrolle)	1,50	1,50	100
0,13	1,50	1,28	85,33
0,33	1,50	1,04	69,33
0,67	1,50	0,70	46,67
1,33	1,50	0,27	18,00
3,33	1,50	0,06	4,07
5,00	1,50	0,03	2,07

AHPrBP mmol/l	Gesamtcalcium mmol/l	freies Calcium mmol/l	ionisierter Anteil %
0 (Kontrolle)	1,43	1,43	100
0,2	1,37*	1,28	89,51
0,5	1,08*	1,04	72,73
1	0,68*	0,66	46,15
2	0,18*	0,17	11,89
5	0,15*	0,02	1,47

PrBP mmol/l	Gesamtcalcium mmol/l	freies Calcium mmol/l	ionisierter Anteil %
0 (Kontrolle)	1,51	1,51	100
0,2	1,51	1,36	90,07
0,5	1,51	1,24	82,12
1	1,51	1,08	71,52
2	1,42*	0,82	54,30
5	1,29*	0,46	30,46

* = Präzipitation

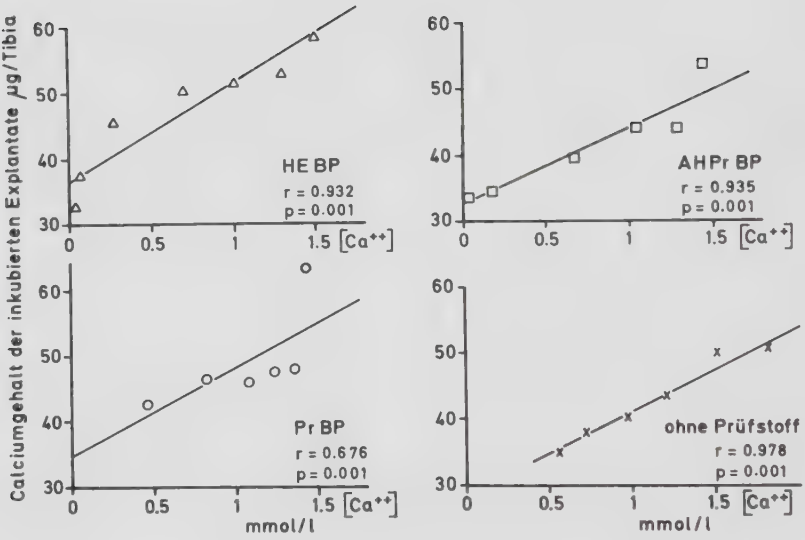


Abb. 20 : Zusammenhang zwischen ionisiertem Calcium des Nährmediums (Abszisse) und Calciumgehalt der Explantate (Ordinate). Die Veränderung der Konzentration des ionisierten Calciums ist durch Zugabe der Bisphosphonate bzw. Modifikation des Nährmediums (ohne Prüfstoff) bewirkt worden.

5. Diskussion

5.1. Mineralisation in vitro

(Einfluß von Na-ß-glycerophosphat auf kultivierte Tibiae)

Eine physiologische Mineralisation in Organ- u. Gewebekulturen ist von bestimmten Voraussetzungen abhängig; diese müssen ebenso bei der Mineralisation in vivo erfüllt sein. Primär ist die Existenz von Zellen notwendig, die in der Lage sind, die spezifischen, organischen Matrixbestandteile des Knochengewebes zu synthetisieren. Erst wenn diese calcifizierbare Matrix vorhanden ist, kann eine physiologische Mineralisation einsetzen. Hierfür sind einmal die Osteoblasten selbst, oder Mesenchymzellen, welche zu diesen differenzieren können, erforderlich. Dabei handelt es sich also zunächst um Anforderungen, die an das biologische Material der Kulturen zu stellen sind. Eine spontane Differenzierung von Mesenchymzellen zu Osteoblasten ist in vitro bislang nicht beobachtet worden, sofern nicht offensichtlich bereits in vivo der genetische Anstoß hierzu erfolgt ist. Diese Überlegungen stammen von Caplan et al. (1983) und Marvaso u. Bernard (1977). Beide Arbeitsgruppen sprechen von einer genetischen Induktion der Mesenchymzellen hinsichtlich einer späteren Differenzierung, bevor morphologische Anzeichen einer Osteoblastenentstehung zu erkennen sind.
Beim vorliegenden Versuchsobjekt der fetalen Mäusetibiae handelt es sich um Knochenanlagen, die am Exzisionstag bereits einen hohen Reifezustand aufweisen (Shepard 1980). Dies konnte durch eigene Analysen der Explantate bestätigt werden, die zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Mineralisation und eine intensive Kollagensynthese dokumentieren.(s.4.1.)

Somit dürften die Ursachen für das in den Vorversuchen beobachtete Ausbleiben der Mineralisation bei dem bieher verwendeten

Arbeitsmodell in der Zusammensetzung des Kulturmediums liegen. In der Literatur werden verschiedene Zusätze der Nährmedien erwähnt, um eine Synthese aller knochenspezifischen Matrixbestandteile in der Gewebe- und Organkultur zu erreichen. In diesem Zusammenhang konnte Hinrichs (1979) am gleichen Arbeitsmodell zeigen, daß dem Kulturmedium Ascorbinsäure zugesetzt werden muß, um eine Kollagensynthese der Explantate zu ermöglichen.

Lange Zeit versuchte man durch Zugabe biologischer Materialien diese Probleme zu lösen (Endo 1960). Es wurden hierzu unter anderem Embryonalextrakte und Seren benutzt. Bislang nicht bekannte Bestandteile dieser natürlichen Zusätze scheinen dafür verantwortlich zu sein, daß unter ihrem Einfluß eine große Zahl von Zell- und Gewebearten bzw. isolierter Organe ein deutlich besseres Wachstumsverhalten in vitro zeigen (Reynolds 1972). Paradoxerweise wurde jedoch auch beobachtet, daß Serum die Mineralisation hemmen kann. Ursache für diesen Effekt sind vermutlich präzipitationshemmende Eigenschaften (z.B: durch Pyrophosphat u. Polypeptide) (Ramp u. Neumann 1971). Darüber hinaus diskutiert Endo (1960) auch die zunehmende komplexe Bindung des Calciums an Plasmaprotein bei hohem Serumanteil, die den diffusionsfähigen Anteil des Calciums erniedrigt. Diese Wirkung konnte durch eigene Vorversuche mit erhöhtem Serumzusatz bestätigt werden.

Neben diesen nicht definierten Zusätzen aus biologischem Material können auch verschiedene chemisch definierte Verbindungen die Mineralisation in vitro fördern. Unter anderem wurden hierzu Insulin, Androgene und andere Hormone benutzt (Reynolds 1972). Auf diese Faktoren soll hier nicht näher eingegangen werden.
Vor allem soll im Folgenden der Einsatz von Phosphaten behandelt werden. Naheliegend ist zunächst die Erhöhung der Konzentration der üblichen anorganischen Phosphate im Medium. Ähnlich den Befunden von Ramp u. Neumann (1971) konnte in Vorversuchen festgestellt werden, daß sich durch Anheben des Phosphatgehaltes des Mediums von ca. 1 mmol/l auf 3 bzw. 4 mmol/l der Calciumgehalt

der Explantate während der Inkubation deutlich erhöhte. Bezüglich des anorganischen Phosphates drängt sich jedoch die Frage auf, ob der Anstieg des Löslichkeitsproduktes von Calciumphosphat nicht zur unspezifischen Ablagerung von Calciumpräzipitaten im Gewebe führt. Dieser Vorgang würde natürlich nichts mehr mit einer biologischen Mineralisation gemeinsam haben.

In neueren Arbeiten wird als weitere Möglichkeit zur Beeinflussung der Mineralisation der Zusatz einer organischen Phosphatverbindung zum Medium beschrieben (Tennenbaum 1981, Tennenbaum u. Heersche 1982, Ecarot-Charriere et al. 1983). Die Verwendung des ß-Glycerophosphates steht hierbei im engen Zusammenhang mit der Mineralisationstheorie. Auf die besondere Bedeutung der Osteoblasten und auf die in den Matrixvesikeln befindliche alkalische Phosphatase wurde bereits in der Einleitung hingewiesen. Die Entdeckung der phosphatasereichen Matrixvesikel und ihre räumliche Beziehung zu den Orten der Mineralisation haben der Sättigungstheorie zu neuen Argumenten verholfen. So sollen die Matrixvesikel ein Mikrokompartiment schaffen, in dem lokal die Calcium- und Phosphatkonzentration ansteigen kann. Dem Glycerophosphat kommt dabei als Substrat der alk. Phosphatase eine besondere Bedeutung zu. Der Grundgedanke zur Verwendung des Glycerophosphates bei Kultivierung von Knochenanlagen ist somit die Bereitstellung einer ausreichenden Menge an organischem Phosphat. Im Zuge der einsetzenden Mineralisation kann von den Osteoblasten enzymatisch die Konzentration des anorganischen Phosphates in Ihrer Umgebung erhöht werden.

Die wenigsten Kulturmedien enthalten in ihrer Grundzusammensetzung organische Phoshatverbindungen. Meist ist der Serum- oder Embryonalextraktzusatz die einzige Quelle für diese Substanzen. Tennenbaum (1981) weist hinsichtlich dieser Problematik darauf hin, daß die normale Konzentration von organischem Phosphat in der Extrazellulärflüssigkeit etwa 10 mmol/l beträgt. Durch den Zusatz von 15% Serum wird diese Konzentration nicht annährend erreicht. In Versuchen mit Glycerophosphat am Periost embryonaler Hühnercalvarien fand derselbe Autor je nach Inkubationsmethode einen unterschiedlich hohen Bedarf an organischem Phosphat.

Während in einem chemisch definierten Medium (also serumfreien) ein Zusatz von 10 mmol/l zur vollständigen Mineralisation erforderlich war, benötigten die Kulturen auf Plasmaclots nur 5 mmol/l Glycerophosphat. Die eigenen Versuche mit 15% Serumanteil weisen eine ähnliche Konzentationsabhängigkeit des Calciumeinbaus auf. Der maximale Calciumeinbau wurde bereits bei 7,5 mmol/l Glycerophosphat erreicht. Interessanterweise fand Tennenbaum bereits 82% des maximalen Effektes bei einer Konzentration von 2,5 mmol/l im chemisch definierten Medium. Offensichtlich ist die Abwesenheit von Kristallisationsinhibitoren des Serums hierfür verantwortlich.

Um die Mineralisation unter Glycerophosphateinfluß zu charakterisieren, führten Ecarot-Charrier et al. (1983) Untersuchungen an isolierten Osteoblasten aus Mäusecalvarien durch. Sie konnten hierbei zeigen, daß unter Zusatz von 10 mmol/l Glyceroposphat eine Matrixmineralisation auftrat, die der in vivo ablaufenden vergleichbar ist. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten nadelförmige Apatitkristalle in enger Beziehung zur Querstreifung der Kollagenfibrillen. Darüber hinaus waren die ersten Apatitkristalle in der Nähe der Matrixvesikel zu sehen. Als weiteren Hinweis auf eine spezifische Mineralisation, in Abgrenzung zu physikochemischen Effekten, führen die Autoren das Ausbleiben der Mineraleinlagerung in murinen Hautfibroblasten an, die unter identischen Bedingungen kultiviert wurden. Tennenbaum u. Heersche (1982) benutzen eine Versuchsanordnung, bei der das freipräparierte Periost embryonaler Hühnercalvarien so gefaltet wurde, daß die Innenseite (osteogenic layer) nach innen und die faserige Bindegewebsschicht nach außen lag. Nur die Innenschicht des Periosts kann durch Differenzierung Osteoblasten bilden. Die histologische Untersuchung der Präparate ließ eine Osteoidbildung auf der Innenseite erkennen. Und nur hier kam es unter dem Einfluß von Glycerophosphat zur Mineralisation. Die Autoren sprechen von einer klaren Grenzschicht zwischen mineralisiertem und unmineralisiertem Osteoid und vergleichen diese mit der Mineralisationsfront in vivo.

Die eigenen Befunde gestatten keinen Einblick in diese histolo-

gischen Aspekte der Mineralisation unter Glycerophosphateinfluß. Hinsichtlich einer physiologischen Mineralisation kann festgestellt werden, daß die übrigen Parameter wie Wachstum, Protein-, DNA-Gehalt, so wie die spezifischen Stoffwechselleistungen der Kollagen- und Glykosaminoglykansynthese nahezu unbeeinflußt bleiben. Auf Grund dieser Befunde und Überlegungen wurde das Glycerophosphat als fester Bestandteil in einer Konzentration von 7,5 mmol/l in das Nährmedium aufgenommen.
Abschließend sollen noch Arbeiten von Liu et al. (1983) und Lorenzo et al. (1984) erwähnt werden. Beide Arbeitsgruppen konnten einen hemmenden Einfluß auf die Knochenresorption durch anorganisches Phosphat in vitro zeigen. Lorenzo weist dabei nach, daß dieser Effekt teils ein physikochemischer, teils aber auch ein über zelluläre Effekte vermittelter Vorgang ist. Liu fand eine vergleichbare Wirkung von 5 mmol/l Glycerophosphat in vitro und ebenfalls eine fast vollständige Hemmung der durch Calciummangel provozierten Knochenresorption in vivo. Auf Grund dieser Ergebnisse postuliert er eine systemische Wirkung von Glycerophosphat auf den Knochenstoffwechsel.

5.2. Verhalten der Explantate unter in vitro-Bedingungen

Das für die eigenen Versuche benutzte Modell fetaler Tibiaanlagen hat sich bereits bei der Untersuchung verschiedener Antiphlogistika und Antarthrotika hinsichtlich ihres Einflusses auf mesenchymale Stoffwechselprozesse bewährt (Karzel et al. 1979, Esser 1983, Kröschel 1983). Während bislang der mesenchymale Charakter der Explantate dazu benutzt wurde, Effekten auf den Glykosaminoglykan- und den Kollagenstoffwechsel nachzugehen, sollten nun auch Fragen der Mineralisation aufgegriffen werden. Aus diesem Grunde wurden die Organanlagen nach 18 Tagen statt bisher nach 17 Tagen Tragzeit exzidiert. In dieser Phase laufen entscheidende Veränderungen im bis dahin weitgehend knorpeligen Gewebe ab. Die Untersuchung des Verhaltens der Tibiae in vivo (s.4.1.) dokumen-

tiert eine intensive Kollagensynthese und einen deutlichen Calciumeinbau in die Tibiae. Daneben konnten durch eigene Beobachtungen bei der Präparation der Tibiae eine reichliche Vaskularisierung und eine rotgefärbte Markhöhle festgestellt werden. Daraus folgt, daß der Reifezustand der Organanlagen während der letzten Tage der Tragzeit einer sehr raschen Entwicklung unterliegt, und daß bei der Diskussion der Ergebnisse diese Tatsache berücksichtigt werden muß.

Die Zuwächse an Hydroxyprolin, Uronsäure, Calcium und Gesamtproteinen während der Inkubation, sowie das Flächenwachstum weisen auf eine deutliche Aktivität der typischen Zellen des Stützgewebes hin. Doch trotz dieser eindeutigen Syntheseleistungen der Zellen vermindert sich der DNA-Gehalt und damit die Zellzahl während der Inkubation. Die eigenen biochemischen Daten der Organkulturen lassen nur schwer eine Interpretation dieses Vorgangs zu. Als Ursache für den DNA-Verlust seien drei hypothetische Erklärungen angeführt:

Bei der Präparation der Tibiae können Reste des angrenzenden Bindegewebes am Knochen verbleiben, die während der Inkubation durch autolytische Prozesse abgebaut werden. Wird nun eine DNA-Bestimmung unmittelbar nach Exzision durchgeführt, so werden die Zellen dieser anhaftenden Gewebereste mit erfaßt, während dies nach sechs Tagen Inkubation nicht der Fall ist.

Wie bereits oben erwähnt enthalten die Explantate am Entnahmetag bereits eine rotgefärbte Markhöhle. Es handelt sich hier also schon um eine sekundäre Markhöhle mit Zellen des hämatopoetischen Systems. Mit Entfernung der Tibiae aus dem Organismus wird auch die Verbindung zum Gefäßsystem unterbrochen. Das nun isolierte Organ verliert offensichtlich in vitro die Fähigkeit zur Blutzellbildung, denn nach sechstägiger Inkubation verschwindet die Färbung der Markhöhle. Bei der DNA-Bestimmung frisch exzidierter Tibiae würden die Kerne der Blutzellen wiederum mit erfaßt, wohingegen in inkubierten Knochen keine hämoglobinhaltigen Zellen mehr erkennbar waren.

Als letzte Erklärungsmöglichkeit seien Umbauvorgänge in den Organen genannt. Im Zuge der Umwandlung des primär knorpeligen

Röhrenknochenmodells in Knochengewebe wird durch die Chondroklasten Knorpelsubstanz abgebaut und von den Osteoblasten durch Knochensubstanz ersetzt. Hinzu kommt die Ausbildung der Markhöhle, die ebenfalls einen Abbau der Matrix und zellulärer Bestandteile im Innern des Knochens mit sich bringt. Durch diese Kombination von Umbau- und Abbauvorgängen ist insgesamt betrachtet eine Reduktion der Zellzahl denkbar.
Die Untermauerung dieser Vorstellungen wäre mit Hilfe histologischer Untersuchungen am gleichen Objekt möglich.

5.3. Einfluß einer modifizierten Calciumkonzentration des Nährmediums auf die Tibiakulturen

Der Effekt einer reduzierten Calciumkonzentration im Nährmedium ist von besonderem Interesse, da in der vorliegenden Arbeit Substanzen geprüft wurden, die die Aktivität des ionisierten Calciums herabsetzen. Durch komplexe Bindung des Metallkations an die untersuchten Bisphosphonate (s.4.6.) und die Mellitsäure (4.5.2.2.) wird die Konzentration des ionisierten Calciums gesenkt. Da jedoch nur der freie, ionisierte Anteil für physiologische Prozesse zur Verfügung steht, ergibt sich die Frage, in wie weit die gemessenen Effekte Sekundärwirkungen eines Calciummangels sind. Von daher sollen die Ergebnisse dieser Versuchsreihe mit dazu dienen, die Pharmakaeinflüsse auf das Explantatverhalten zu interpretieren.
Aus den Ergebnissen geht hervor, daß die Tibiae relativ unempfindlich gegenüber einem Calciumentzug sind. Der einzige Parameter, der bei Reduktion der Calciumkonzentration auf 0,55 mmol/l einen deutlichen Einfluß zeigte, ist der Calciumgehalt der Explantate. Bei fast vollständigem Calciumentzug (0,10 mmol/l) geben die Tibiae offensichtlich sogar Calcium an das Medium ab, denn ein Gehalt von 45,67 % der Kontrollen ist nicht allein durch das Ausbleiben des Calciumeinbaus zu erreichen. Dies ergibt sich aus dem Ausmaß der Zunahme des Calciumgehaltes der Explantate während der Inkubation in vitro in Relation zum Calciumgehalt vor

Inkubationsbeginn (vgl. Abschnitt 4.3.). Während das Explantatwachstum kaum, der DNA- und der Proteingehalt selbst bis zu 0,10 mmol/l Calcium praktisch keine Veränderungen zeigten, wurden vermehrt Kollagen und Glykosaminoglykane synthetisiert. Daraus ergibt sich, daß diese spezifischen Stoffwechselleistungen der Osteoblasten bzw. Chondroblasten sogar unter Calciummangel erhöht sind.
In der Literatur war nur wenig über den Calciumbedarf von Knochenanlagen in der Organkultur zu finden. Binderman et al. (1983) beschrieben eine Calciumabhängigkeit der DNA-Synthese von Knochenzellen in vitro. Unter Calciummangel kam es zu einer Hemmung der Vermehrung von Fibroblasten, während die Teilungsrate der Osteoblasten nicht reduziert war. Die Autoren schließen aus den Befunden auf eine Beziehung zwischen extrazellulärem Calciumniveau und Übergang der Zellen in die S-Phase. Die eigenen Ergebnisse lassen keinen Einfluß des extrazellulären Calciums auf die Zellvermehrung erkennen, wohl aber einen solchen auf die Stoffwechsel-Aktivität der Zellen.

5.4. Pharmakaeinflüsse auf die Tibiakulturen

5.4.1. Natriumfluorid

Der Einsatz des Natriumfluorids zur Therapie von Osteopathien basiert ursprünglich auf Beobachtungen endemischer Intoxikationen. Teils werden durch hohe Konzentrationen im Trinkwasser bestimmter Regionen (z.B.: Iran, Indien, Südspanien) große Mengen Fluorid aufgenommen, teils sind es Befunde an Arbeitern, die beruflich hohen Fluorkonzentrationen der Luft ausgesetzt waren (Aluminiumherstellung). Das Krankheitsbild der endemischen oder industriellen Fluorose kann verschiedene Schweregrade erreichen. Zunächst tritt eine Verdichtung der Bälkchenstruktur an Wirbeln

und Becken auf. Bei weiterer Exposition setzt eine Verkalkung der Längsbänder der Wirbelsäule ein. Die Verknöcherung des Bandapparates kann soweit fortschreiten, daß die Wirbelsäule marmorartig verdickt wirkt. Durch Einengung des Wirbelkanals können Paresen auftreten.

Pharmakotherapeutisch wird NaF dazu eingesetzt, die verminderte Knochenmasse bei der Osteoporose durch vermehrten Anbau auszugleichen. Anlaß für die Einführung in die Therapie waren neben den o.g. Beobachtungen auch Befunde, die gezeigt haben, daß in Regionen mit erhöhtem Fluorgehalt des Trinkwassers die Osteoporosehäufigkeit duchschnittlich niedriger als in anderen Gebieten war.

Der Mechanismus der verstärkten Knochenbildung unter Fluoridein-fluß ist noch unbekannt. Offensichtlich ist eine Stimulation der Osteoblasten mitbeteiligt. Wergedal et al.(1981) fanden an menschlichen Knochenzellen in vitro eine geringe Steigerung der DNA-Synthese und eine erhöhte Aktivität der alkalischen Phosphatase durch 0,01 mmol/l NaF, eine Konzentration in der Größenordnung des therapeutischen Plasmaspiegels bei der Osteoporosebehandlung. Im Gegensatz hierzu stehen die eigenen Befunde, welche bei keiner Konzentration einen erhöhten DNA-Gehalt der Explantate erkennen ließen. Holland (1979) berichtete über eine DNA-Synthesehemmung an isolierten Zellkernen ab 3 mmol/l und brachte die Ursache dieser Inhibition mit einer Proteinsynthesehemmung in Zusammenhang. Ebenso fand Kröschel (1983) ab 2 mmol/l NaF einen stark verminderten DNA- Gehalt kultivierter Tibiaexplantate. Für das gleiche Modell beschrieb Esser (1983) eine Hemmung der Protein- und Kollagensynthese, sowie ein vermindertes Wachstum durch 2 mmol/l. Diese letztgenannten Ergebnisse werden durch die eigenen Resultate bestätigt. Bis zu 0,5 mmol/l kam es noch zu einem kontinuierlichen Wachstum der Explantate. Durch 2 mmol/l wurden jedoch sämtliche Stoffwechselfunktionen der Tibiae stark gehemmt. Das Wachstum während der Inkubation wurde nahezu vollständig unterdrückt.

Aus der Literatur ist bekannt, daß Fluorid ab gewissen Konzentrationen als Enzymgift wirkt. Unter anderem werden Phosphatasen und

Enolasen inhibiert. Interessanterweise traten die toxischen Effekte des Fluorids in den eigenen Versuchen gemeinsam mit einem stark erhöhten Calciumgehalt der Explantate auf.
Der Einfluß auf die Mineralisation wird je nach Versuchsmodell und Dosierung des Fluorids unterschiedlich angegeben. Ream (1981) beschreibt an Ratten eine vermehrte Bildung von unterminerali-siertem Osteoid. Er sieht als Ursache hierfür eine Proliferation und Aktivierung der Osteoblasten, welche bei hohen NaF-Dosen abnormes Kollagen absondern. Kombiniert mit einer veränderten Zusammmensetzung des Minerals soll dies zur mangelhaften Mineralisation beitragen. Die eigenen Versuche ergaben keine gesteigerte Matrixsynthese. Lediglich der Uronsäuregehalt war bei niedrigen Konzentrationen leicht erhöht. Bei den Ergebnissen von Ream muß man berücksichtigen, daß es sich um Kurzzeitversuche handelt, bei denen den Tieren über 4 Wochen relativ hohe Dosen (120 ppm) über das Trinkwasser zugeführt wurden. Gössi (1978) berichtete über eine gesteigerte Mineralisation während 4 - 17 monatiger Behandlung mit 100 ppm Fluorid bei Mäusen. Erwähnenswert ist bei dieser Arbeit noch die Geschlechtsabhängigkeit des Effektes. Die weiblichen Tiere zeigten keine signifikante Erhöhung des Minerals, während der Unterschied zu den Kontrollen bei den Männchen hoch signifikant war. Ebenfalls auf das Dosisproblem bei der NaF-Therapie weisen Petrovic und Stutzmann (1978) hin. Bei höherer Dosierung fanden die Autoren eine Hemmung der Knochenresorption verbunden mit Mineralisationsdefekten.
Die Bildung von unterminerali siertem Osteoid (Osteoidose) kann auch in seltenen Fällen beim Menschen unter NaF-Therapie beobachtet werden. Ursächlich hierfür kann ein passagerer Calciummangel sein. Bei einer forcierten Matrixsynthese reicht das normale Calciumangebot nicht aus, um eine vollständige Mineralisation zu ermöglichen. Auf diesen Überlegungen basiert der Zusatz von Calciumsalzen und Vit. D bei der Fluoridtherapie der Osteoporose. Der Wert dieser Zusatzmedikation wird allerdings von Dambacher (1982) in Frage gestellt.
Interessant in diesem Zusammenhang ist die Applikation des Fluorids in Form des Natriummonofluorphosphates mit Calciumglu-

konat und Calciumzitrat. Durch die komplexen Calciumverbindungen und durch die Bindung des Fluors an anorganisches Phosphat wird eine Bildung des schwerlöslichen Calciumfluorids verhindert. Durch hydrolytische Abspaltung des Fluoridions mittels Phosphatasen wird dieses erst unmittelbar vor der Resorption freigesetzt.

Neben der Osteoporosebehandlung spielt das Fluorid und vor allem das Monofluorphosphat eine Rolle in der Kariesprophylaxe. Hier haben verschiedene endemische Erhebungen erwiesen, daß bei dem als optimal angesehenen Fluorgehalt des Trinkwassers von ca. 1mg/l die Karieshäufigkeit stark vermindert ist. Zusätzlich werden Fluorverbindungen Zahnpasten zugesetzt.

An der antikariösen Wirkung des Fluors ist ein physikochemischer Effekt beteiligt. Die Hydroxylgruppe im Apatitkristall kann durch das etwa gleich große Fluoridion ausgetauscht werden. Das Monofluorphosphat kann an Stelle von Phosphationen in das Gitter eingebaut werden. Der so entstandene Fluorapatit ist stabiler gegen Säureeinwirkung. Zusätzlich soll das an der Zahnoberfläche adsorbierte Fluorid toxisch auf die Plaque-bildenden Bakterien wirken und auf diese Weise Läsionen des Zahnschmelzes verhindern (Schamschula et al.1981). Mellberg und Mallon (1984) beschreiben ebenfalls an einem in vitro-System menschlicher Molaren eine verbesserte Remineralisation artifizieller Verätzungen.

Weiterhin berichten Varughese u. Moreno (1981) über eine beschleunigte Apatitkristallisation durch NaF in vitro. Die Tatsache, daß der Calciumgehalt der Explantate bei den eigenen Versuchen auch bei toxischer NaF-Konzentration (2 mmol/l) erhöht ist, läßt eine Mitbeteiligung eines physikochemischen Effektes dieser Art vermuten.

5.5.2. Mellitsäure

Die meisten bisher veröffentlichten Arbeiten über potentielle biologische Effekte der Mellitsäure beschäftigen sich mit ihrem Verhalten gegenüber Apatit und Calcium. Dabei handelt es sich vorwiegend um Ergebnisse an in vitro- Modellen. So ist die physikochemische Wirkung der Mellitsäure auf das Kristallwachstum des Apatits untersucht worden (Francis et al. 1977). Ähnlich den Polyphosphaten und Bisphosphonaten hemmt die Substanz die Kristallbildung von Calciumsalzen. Die Ursache für diesen Effekt wird von Leach (1978) in der polyanionischen Struktur der Verbindung vermutet. Ähnlich wie bei den Polyphosphaten kommt es an der Kristalloberfläche zur Adsorption des Inhibitors. Für das Mellitat wird die Bildung von vier Bindungsstellen zwischen Apatit und der Polycarbonsäure beschrieben (Voegel et al. 1981). Zahntke (1985) konnte an Rattenschwanzkollagen eine mineralisationshemmende Wirkung feststellen. Therapieversuche mit lokaler Injektion bei einem Patienten mit Myositis ossificans progressiva hatten zunächst eine günstige Wirkung, die allerdings die spätere Ossifizierung doch nicht verhindern konnte (Münzenberg 1985).
Bickel (1984) fand an Kulturen fetaler Mäusefibroblasten eine gesteigerte Glykosaminoglykansynthese bei Konzentrationen, die noch keine Beeinträchtigung der Lebens- und Vermehrungsfähigkeit der Zellen zeigten. Versuche mit Ehrlich-Ascites-Tumorzellen ergaben eine relativ geringe Zytoxizität der Mellitsäure (Bickel 1984).
Die eigenen Versuche bestätigen die von Bickel beschriebene Anregung der Glykosaminoglykansynthese. Ebenso wirkt die Mellitsäure erst bei verhätnismäßig hohen Konzentrationen toxisch auf die Explantate. Sehr deutlich wirken sich die calciumkomplexierenden Eigenschaften, die bereits in Kapitel 4.5.2.2. beschrieben wurden, auf die Explantate aus. Dosisabhängig kommt es zur starken Hemmung des Calciumeinbaus während der Inkubation. Die enge Korrelation zwischen Calciumgehalt der Explantate (s.4.5.2.2.) und dem Gehalt an ionisiertem Calcium im Nährmedium

deutet auf eine physikochemische Ursache dieser Mellitsäurewirkung hin.
Der Einfluß auf die Glykosaminoglykansynthese dagegen ist kein sekundärer Effekt, der auf einem Mangel an ionisiertem Calcium beruht. Dies konnte durch die Versuche mit modifizierten Calciumkonzentrationen im Nährmedium gezeigt werden. (4.4.)
Problematisch bei einer Therapie heterotoper Ossifikationen ist die mögliche Bildung schwerlöslichen Tricalciummellitats. Das Auftreten kristalliner Ablagerungen im Gewebe ist in diesem Zusammenhang sicherlich kritisch einzuschätzen. Dabei bleibt natürlich offen, ob in vivo derart hohe Konzentrationen, wie sie hierfür erforderlich wären zur Therapie benötigt werden.
Hinsichtlich eines potentiellen therapeutischen Einflusses auf die Bildung ektopischen Knochengewebes sind die Mellitsäurewirkungen kritisch zu bewerten. Während zwar die Mineralablagerung durch die Substanz verhindert werden könnte, unterbleibt offenbar eine anzustrebende Hemmung der Kollagen- bzw. GAG-Synthese. Im Gegensatz hierzu fand unter dem Einfluß der Mellitsäure sogar eine Vermehrung der GAG-Produktion statt. Jedoch bleibt zu Überlegen, ob und in welchem Rahmen eine fördernde Wirkung auf die Stoffwechselleistungen der Chondroblasten (oder auch Chondrozyten) ausgenutzt werden könnte.

5.4.3. Bisphosphonate

Die Bisphosphonate sind Verbindungen, welche Strukturanaloge des organischen Pyrophosphates darstellen. Während das Pyrophosphat eine P-O-P- Bindung besitzt, tragen die Bisphosphonate eine P-C-P- Bindung. Die beiden Phosphonsäuregruppen sind also an ein geminales Kohlenstoffatom gebunden. Die P-O-P-Bindung im Pyrophosphat kann durch hydrolytische Enzyme sehr rasch metabolisch gespalten werden. Ein solcher Abbau ist bei den Bisphosphonaten nicht möglich. Erste Aufmerksamkeit im Zusammenhang mit der Mineralisation erlangte das Pyrophosphat durch Beobachtungen von Fleisch und Neuman (1961). In vitro konnte festgestellt werden, daß Plasma die Ausfällung von Calciumphosphat hemmte. Dieser Effekt war durch Zugabe von alkalischer Phosphatase aufzuheben. Bereits 20 Jahre vorher war bekannt, daß Polyphosphate die Präzipitation von Calciumcarbonat hemmen. Dieses Prinzip wird bis heute noch in vielen Waschmitteln benutzt, indem man durch Zusatz von Natriumtripolyphosphat verhindert, daß sich beim Waschvorgang schwerlösliche Kalkseifen bilden. Das Pyrophosphat konnte dann 1962 von Fleisch und Bisaz aus dem Urin isoliert werden und wurde als die für die kristallisationshemmende Wirkung verantwortliche Substanz erkannt. Ein klinisches Interesse an den genannten Wirkungen leitet sich aus verschiedenen Erkrankungen ab, die mit einer gestörten Mineralisation oder pathologischen Demineralisation einhergehen. Wegen der metabolischen Instabilität des Pyrophosphates war allerdings die pharmakotherapeutische Anwendung nicht möglich. Auf Grund dieser Tatsachen kam es zur Synthese der Bisphosphonate. Die gemeinsame Struktur der Bisphosphonate ist das zentrale C-Atom mit den beiden Phosphonsäuregruppen. Durch unterschiedliche Substitution an den beiden anderen Bindungen des C-Atoms ist eine Vielzahl von Derivaten synthetisiert worden.

Die Bisphosphonate zeigten dann auch ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften wie das Pyrophosphat in vitro. Auf Grund der metabolischen Stabilität der Verbindungen, konnten nun auch im Tierexperiment die Effekte der Bisphosphonate untersucht

werden. Hauptwirkungen der Bisphosphonate waren eine Hemmung der Mineralisation und der Knochenresorption.
Lange Zeit glaubte man, den Hauptwirkungsmechanismus in den physikochemischen Eigenschaften der Stoffe zu sehen. Doch vor allem durch den Vergleich der verschiedenen Derivate wurde deutlich, daß eine ganze Reihe von Stoffwechselprozessen durch die Bisphosphonate beeinflußt werden. Hierbei ergaben sich deutliche Unterschiede je nach Substitution der Stoffe (Shinoda et al. 1983). Ebenso deutet die Unwirksamkeit von Polyvinylphosphonaten auf die Mineralisation ektopischen Knochengewebes auf einen zellulären Angriffspunkt der Bisphosphonate hin. Denn bei vergleichbaren physikochemischen Eigenschaften der Polymere ist die Diffusion in das Zellinnere nicht möglich (Rath et al. 1984).

Die Wirkung der Bisphosphonate auf den Organismus zeigt sich beinahe ausschließlich am Skelett. Dies ist nach den Befunden von Wiedmer et al. (1983) erstaunlich, da für das HEBP nur eine etwa 25%ige Proteinbindung gefunden wurde, und der Übertritt in den Extravaskulärraum sehr leicht möglich ist. Die Autoren schließen hieraus auf die Möglichkeit potentieller Wirkungen auch auf andere Gewebe neben dem Skelettsystem.
In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen von Kramsch et al. (1981) von Interesse. An einem Arteriosklerosemodell beim Affen fanden die Autoren einen antisklerotischen Effekt von calciumbindenden Substanzen wie EDTA, Bisphosphonaten und Lanthan, einem spezifischen Calcium-Ionen-Antagonisten. Dieser Effekt trat unabhängig vom erhöhten Cholesterolspiegel der Versuchstiere ein, und wird mit der Calciumfunktion bei der Spaltung energiereicher Phosphate und der Muskelrelaxation gesehen. Die untersuchten Aorten enthielten als Folge der Behandlung mit den genannten Stoffen weniger Kollagen, Elastin, Calcium und DNA als die sklerotischen Gefäße der nichtbehandelten Tiere. Erstaunlicherweise wurden diese Wirkungen mit Dosierungen erreicht, die keine Veränderungen der Knochendichte, des Calcium-, Phosphor- und Kollagengehaltes des Knochens verursachten. An dieser Stelle sei auch auf den Beitrag von Lossnitzer et al. (1983) über Cal-

ciumantagonisten verwiesen. Dort wird eine Calciumüberladung der Gefäßmuskulatur durch hohe Dosen von Vit.D_3 hervorrufen, die zu typischen sklerotischen Gefäßschäden führten. Durch Calciumantagonisten konnte die Entstehung der sklerotischen Plaques und der intra- wie extrazellulären Calciumpräzipitate verhindert werden. Fleckenstein (1983) sieht hierin einen zusätzlichen Angriffspunkt der Calciumantagonisten mit protektiven Effekten gegenüber kardiovaskulären Erkrankungen.
Die Ursache für den Hauptangriffspunkt der Bisphosphonate am Skelett liegt in der hohen Affinität der Stoffe zum kristallinen Apatit und zum Calcium in den Knochen. Nach Applikation werden die Substanzen ähnlich den Tetrazyklinen rasch in das Knochengewebe eingelagert. Diese Eigenschaft nutzt man bei der Anwendung in der Szintigraphie aus (Smith et al. 1984).

5.4.3.1. 1-Hydroxyethyliden-1,1-bisphosphonat (HEBP)

Der einzige bisher als Arzneimittel im Handel befindliche Vertreter der Bisphosphonate ist das HEBP. Die registrierte INN-Bezeichnung ist Etidronsdäure. Nach alter Nomenklatur wurden die Bisphosphonate auch häufig als Diphosphonate bezeichnet, woher die geläufigere Abkürzung EHDP für die Etidronsäure stammt. Das Pharmakon ist primär zur Therapie des Morbus Paget zugelassen. HEBP stellt wohl unter den Bisphosphonaten die am meisten untersuchte Substanz dar. Eine Fülle von Ergebnissen aus Zell- und Organkulturen sowie aus Tierversuchen und klinischen Studien liegt vor. Nach dem heutigen Kenntnisstand ist die Hauptwirkung des HEBP eine Hemmung der osteoklastären Knochenresorption und eine verminderte Mineralisation. Vor allem die gehemmte Knochenresorption ist bei der Therapie des Morbus Paget von Interesse. Die Ursache für die Inhibition der Osteolyse ist bis heute nicht geklärt. Lerner und Larson (1984) beschrieben eine Verminderung der Freisetzung lysosomaler Enzyme von Organkulturen durch HEBP bei gleichzeitig verminderter Calciummobilisierung aus den Knochen. Diese Wirkung ist insofern von Bedeutung, als den lyso-

somalen Enzymen eine entscheidende Funktion bei der enzymatischen Degradation der Knochenmatrix im Rahmen der Knochenresorption zugeschrieben wird.

Eine verminderte Neubildung von Osteoklasten bei unbeeinflußter Resorptionsaktivität, beobachteten Boonekamp und Bijvoet (1983). Weiterhin läßt sich durch HEBP eine gesteigerte Knochenresorption beim Hyperparathyreoidismus beheben (Yates et al. 1983). Evans et al. (1982) fanden in Langzeitversuchen mit HEBP an Ratten eine verminderte Osteoklastenzahl bei gleichzeitig eingeschränkter Knochenresorption. In den gleichen Versuchen wurde auch eine verkleinerte Markhöhle der Röhrenknochen gefunden. Trotz dieser Hemmeffekte kam es zur gesteigerten periostalen und endostalen Knochenbildung.
Klinisch kommt es bei der Behandlung des Morbus Paget mit HEBP zur Senkung der Hydroxyprolinausscheidung und der Aktivität der alkalischen Serumphosphatase (Siris et al. 1981, Siris et al. 1980). Beide Parameter sind bei dieser Erkrankung stark erhöht und spiegeln den gesteigerten Kollagenabbau bzw. Knochenanbau wider. Die bisher erwähnten Befunde befassen sich allesamt mit der Knochenresorption. Die Beeinflussung der Knochenresorption steht im Mittelpunkt des Interesses der Bisphosphonatwirkungen, da gerade dieser Vorgang beim Morbus Paget gestört ist. Wirkungen auf den Knochenanbau und die Mineralisation sind insofern ebenso von Interesse, als bei systemischer Therapie der Erkrankung auch gesunde Knochen den Pharmakaeffekten ausgesetzt sind. Weiterhin gibt es andere Störungen, bei denen eine pathologische Knochenbildung und Mineralisaion durch die Bisphosphonate beeinflußt werden sollen. Stellvertretend seien hier die Myositis ossificans und heterotope Ossifikationen nach totalem Hüftgelenksersatz genannt (v. Schnakenburg et al. 1982, Bijoevet 1982 und Lowell et al. 1982).
Beim eigenen Versuchsobjekt handelt es sich um fetales Ausgangsmaterial, bei dem die Wachstumsprozesse sehr ausgeprägt sind. Dies dokumentiert sich vor allem in den Ergebnissen der durchgeführten in vivo-Untersuchungen (s. 4.1.), wie auch im

Verhalten der Explantate unter Kontrollbedingungen (s. 4.3.). Wenn auch bei den fetalen Knochenanlagen Resorptionsvorgänge ablaufen (beispielsweise bei der Ausbildung der Markhöhle), so überwiegen doch deutlich die Anbauvorgänge. Da sich die vorliegenden Untersuchungen der Prüfstoffwirkungen auf biochemische Analysen der Explantate nach Inkubation stützen und keine Differenzierung zwischen An- und Abbauvorgängen gemacht werden kann, sind Aussagen über eventuelle osteolytische Vorgänge kaum möglich. Um an fetalem Untersuchungsmaterial Knochenresorptionsprozesse studieren zu können, ist der Einsatz von markierten Substanzen erforderlich, die dem Muttertier appliziert werden und deren Abgabe aus Explantaten an das Medium anschließend gemessen wird. Manche Autoren führen zudem durch Zugabe von Parathormon oder Prostaglandin E_2 zum Kulturmedium eine künstliche Steigerung der Knochenresorption herbei. (Keck et al. 1983, Schelling et al. 1980).

Im Mittelpunkt der eigenen Versuche standen somit Wirkungen auf Mineralisation, Wachstum und Synthesevorgänge in den Explantaten. Die beobachtete Hemmung des Calciumeinbaus in die Tibiae steht im Einklang mit der in vivo nachgewiesenen Mineralisationshemmung durch HEBP. Bei der Therapie des Morbus Paget ist diese Wirkung als unerwünscht anzusehen und kann zur medikamentösen Osteoidose führen. Durch Dosisreduktion bzw. Intervalltherapie wird versucht dieses Nebenwirkungsrisiko zu mindern (Johnston 1983, Preston et al. 1983).

Während die Hemmung der osteoklastären Knochenresorption vermutlich auf zellulären Effekten beruht, dürften für die Mineralisationsstörung die physikochemischen Eigenschaften des HEBP verantwortlich sein. Zu diesem Schluß kamen Shinoda et al. (1983). Meist wird diesbezüglich der biologische Effekt mit der Hemmwirkung auf das Apatitkristallwachstum korreliert. Bei den eigenen Versuchen wurde mittels einer ionenselektiven Elektrode die Aktivität des Calciums im Kulturmedium bestimmt. Hierbei zeigte sich eine deutliche Verminderung des ionisierten Anteils des Calciums durch das HEBP (s. 4.6.). Abb. 20 läßt eine gute Korrelation zwischen der Konzentration des ionisierten Calciums im Inkuba-

tionsmedium und dem Calciumgehalt der Explantate erkennen. Annähernd der gleiche Kurvenverlauf ergab sich für die modifizierte Calciumkonzentration des Nährmediums ohne Prüfstoffzugabe. Die Ergebnisse sprechen daher ebenso für eine physikochemische Ursache der beobachteten Wirkung. Die Fähigkeit von Bisphosphonaten mit Calcium Komplexe zu bilden, ist bereits länger bekannt. Die dabei entstehenden komplexen Verbindungen hängen von der Struktur des jeweiligen Phosphonates ab. Für das HEBP wird die Bildung polynuklearer Komplexe beschrieben (Grabenstetter und Cilley 1971). Es handelt sich hierbei um größere Aggregate aus Calcium-HEBP-Komplexen, die einen micellaren Charakter aufweisen. Die kolloidalen Teilchen sind löslich und führen selbst bei der in den eigenen Versuchen höchsten Konzentration von 5 mmol/l HEBP und 1,5 mmol Calcium nicht zu Präzipitaten. Shakhmatova et al. (1982) fanden ebenfalls einen calciumbindenden Effekt des HEBP, der mittels Beeinflussung der osmotischen Aktivität von Membranen gemessen wurde. Die Autoren weisen darauf hin, daß der Entzug des Calciums aus biologischen Flüssigkeiten entscheidende Auswirkungen auf die Aktivität einer Reihe von Enzymen haben kann. Ob in vivo hinreichend hohe Konzentrationen erreicht werden können, um eine physikochemische Entcalcifizierung der Extrazellulärflüssigkeit herbeizuführen, ist nicht bekannt. Doch ist an eine Anreicherung der Bisphosphonate im Skelettsystem zu denken, die durch die hohe Affinität zum Knochengewebe zustande kommt.

Die Calciumkomplexierung durch HEBP ist vermutlich auch Ursache für eine reduzierte Calciumresorption aus dem Darm nach oraler Applikation des Bisphosphonates (Baxter et al.1979). Durch Komedikation mit Vit.D_3 läßt sich diese Wirkung teilweise aufheben. Gleichzeitig wird vermehrt Phosphat aus dem Darm resorbiert, da durch Verarmung an ionisiertem Calcium die Menge an ungebundenem Phosphat ansteigt. Die eintretende Hyperphosphatämie läßt sich zur Einstellung der erforderlichen Dosis bei der Therapie des Morbus Paget ausnützen (Münzenberg, persönliche Mitteilung). Dies ist von Bedeutung, da die Resorptionsquote von Patient zu Patient beträchtlichen Schwankungen unterliegen kann.

Unter der Einwirkung mittlerer HEBP-Konzentrationen (0,33 - 1,33

mmol/l) kommt es zu einer geringfügig erhöhten Kollagen- bzw. Glykosaminoglykansynthese. Ähnliche Ergebnisse publizierten auch Wong und Klein (1983), die an Hunden eine vermehrte Synthese von untermineralisiertem Osteoid beschrieben. Die selben Autoren (Klein und Wong 1983) fanden an Hühnern eine vollkommen gehemmte Mineralisation ohne eine Beeinflussung des Kollagengehaltes der Knochen. In der Diskussion ihrer Ergebnisse weisen die Autoren auf die Speziesabhängigkeit der HEBP-Wirkung hin. Zumal muß hierbei beachtet werden, daß eine Reihe von Arbeiten auf diesem Gebiet unter Verwendung von Hühnern gemacht worden ist. Dabei handelt es sich um Vögel, deren metabolisches Verhalten generelle Abweichungen vom Nagetier bzw. Säugetierorganismus beinhaltet. Die Erhöhung der GAG-Synthese steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Palmoski und Brandt (1978), die eine Verminderung der GAG-Synthese am Kaninchenknorpel fanden. Die Autoren diskutieren die Möglichkeit einer über Calciumentzug bedingten Hemmwirkung auf die Synthese. Jedoch die eigenen Ergebnisse mit einer modifizierten Calciumkonzentration im Nährmedium bzw. mit dialysiertem Serum (s. 4.4., bzw. Abb. 11 u.12) ergaben ebenso gegenteilige Effekte. Während in der zitierten Arbeit das Calcium als notwendiger Co-Faktor der GAG-Synthese bezeichnet wird, zeigen die eigenen Untersuchungen eher eine Stimulation der Synthese bei Calciumentzug.

Der wohl interessanteste Effekt des HEBP auf die Explantate ist der Anstieg des DNA-Gehaltes bei 1,33 und 3,33 mmol/l. Vergleichbare Ergebnisse konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Jedoch ist hierbei das Alter der Explantate von entscheidender Bedeutung. Die meisten Arbeiten mit Organkulturen wurden an jüngeren, weniger differenzierten Knochenanlagen durchgeführt. Ebenso ist hierbei darauf hinzuweisen, daß der Entwicklungszustand nicht unbedingt mit dem Alter der Organanlagen gleichzusetzen ist. Die häufig benutzten Rattentibiae beispielsweise sind verglichen mit denen von Mäusen wesentlich weniger differenziert, betrachtet man den gleichen Zeitpunkt der Tragzeit (Shepard 1980). Weiterhin ist auf den DNA-Verlust bei Inkubation unter Kontrollbedingungen hinzuweisen (s. 4.3.). In Kapitel 5.2. wurde

dieses Phänomen näher diskutiert. Offensichtlich werden die Vorgänge, die zum Zellverlust während der Inkubation führen, durch HEBP derart gehemmt, daß der DNA-Verlust nicht nur kompensiert, sondern in einen geringen Zuwachs überführt wird. Wie in 5.3. bereits angeführt, sollten histologische Untersuchungen dazu beitragen die Ursache für den erhöhten DNA-Gehalt zu klären. Von Interesse in diesem Zusammenhang wird eine mögliche Veränderung des Osteoblasten/Chondroblasten-Verhältnisses sein. Aus den eigenen biochemischen Parametern kann diesbezüglich keine Aussage gemacht werden.

5.4.3.2. 1-Amino-3-hydroxypropyliden-1,1-bisphosphonat (AHPrBP)

Die im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Nachteile des HEBP bei der Therapie des Morbus Paget, nämlich eine unerwünschte Hemmung der Mineralisation gesunder Skelettbezirke, veranlaßten dazu, andere Bisphosphonate auf ein günstigeres Wirkprofil hin zu untersuchen. Neben dem sehr häufig beschriebenen Dichlormethylenbisphosphonat (Cl_2 MBP) ist hierbei das AHPrBP geprüft worden. Entscheidender Unterschied zum HEBP ist neben der Verlängerung des Kohlenstoffgerüstes um ein C-Atom, die zusätzliche Aminogruppe des Moleküls. In zahlreichen Publikationen, in denen verschiedene Bisphosphonate miteinander verglichen wurden, ragte das Aminoderivat als die Verbindung heraus, welche die stärkste Hemmwirkung auf die Knochenresorption hat (Shinoda et al. 1983, Boonekamp und Bijvoet 1983, Klein und Wong 1983). Hierbei ist offensichtlich eine Konzentration erforderlich, die noch keine Beeinträchtigung der Mineralisation verursacht. Reitsma et al. (1980) fanden an Ratten erst eine halbmaximale Hemmung der Mineralisation bei 50fach höheren Dosen als zur halbmaximalen Resorptionshemmung erforderlich waren. Frijlink et al. (1979) bestätigen dies in einer klinischen Studie an Patienten mit Morbus Paget. Hierin scheint die besondere Eigenschaft des AHPrBP zu liegen, denn grundsätzlich hat diese Verbindung ähnliche physikochemische Eigenschaften wie das HEBP. D.h., es kommt ebenso wie beim HEBP durch die Affinität zum Calcium zur Komplexbildung

und damit zur Hemmung des Calciumeinbaus in das Skelett. Die eigenen Versuche zeigten ein ähnliches Verhalten der Tibiae wie unter HEBP-Einwirkung. Der Calciumgehalt der Explantate war bei allen geprüften Konzentrationen signifikant erniedrigt. Die Reduktion des ionisierten Calciumanteils im Nährmedium durch AHPrBP-Zusatz ist vergleichbar mit der durch das HEBP (s. Abb. 19). Die eigenen Messungen bestätigen die Angaben von Glatt (persönliche Mitteilung 1984). Bereits bei niedrigen Konzentrationen ab 0,17 mmol/l wurde eine Trübung der Prüflösung beobachtet. Mit weiterer Erhöhung der AHPrBP-Konzentration bildeten sich Präzipitate. Die Eigenschaften des entstehenden Calciumkomplexes werden in der Literatur nicht beschrieben. Es läßt sich lediglich an Hand der vorliegenden Ergebnisse feststellen, daß der Komplex im Gegensatz zum HEBP-Komplex nicht aus löslichen Micellen besteht und bei physiologischem pH zu Calciumpräzipitaten führt. Auf Grund der chemischen Struktur liegt die Vermutung nahe, daß die Aminogruppe eine zusätzliche Koordinationsstelle für Calcium darstellt. Das freie Elektronenpaar des Stickstoffes fungiert bei anderen Komplexen ebenfalls als koordinative Bindung zu Metallkationen. Als Beispiel seien EDTA und das D-Penicillamin genannt, bei denen die Aminogruppen als Elektronenpaardonatoren dienen. Das Verhältnis von Calcium : Bisphosphonat kann dadurch verändert sein, und die Bildung polynuklearer, löslicher Komplexe wie beim HEBP verhindern. Bei Betrachtung der Meßwerte in Tab. 20 fällt auf, daß die verbleibende Gesamtcalciummenge nach Abzentrifugation der Präzipitate einen Wert ergibt, der der molaren Differenz von AHPrBP und der Ausgangscalciumkonzentration entspricht. Das könnte bedeuten, daß das AHPrBP einen 1:1 Komplex mit Calciumionen bildet, der dann spontan ausfällt. Um dieser Spekulation nachzugehen, sind weitere, aufwendigere physikochemische Untersuchungen erforderlich.

Obwohl neuere Arbeiten über die Bisphosphonate den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Verbindungen geringere Bedeutung beimessen als dies früher der Fall war, müssen diese Effekte bei Beurteilung der Gesamtwirkung beachtet werden. Boonekamp und Bijvoet (1983) fanden unterschiedliche AHPrBP-Effekte an einem

Makrophagenmodell bei verschiedenen extrazellulären Calciumkonzentrationen. Die Verfasser dieser Publikationen diskutieren die messenger-Funktion des Calciums und belegen dies durch Experimente mit einem Calciumionophor bzw. Calciumantagonisten. Shinoda et al. (1983) haben in einer äußerst umfangreichen Arbeit 14 verschiedene Bisphosphonate an Zell- und Organkulturen, am Ganztier und hinsichtlich physikalisch-chemischer Effekte auf Apatitkristalle untersucht. Sie kommen zu dem Schluß, daß es keine regelrechte Strukturwirkungsbeziehung gibt, sondern daß die gemeinsame Stuktur des Bisphosphonsäurerestes nur die Affinität zum Knochengewebe herstellt. Die eintretenden Wirkungen auf die Funktionen der Knochenzellen können dann sehr unterschiedlich sein und so sollte jede Substanz hinsichtlich ihrer pharmakologischen Wirkung für sich betrachtet werden. AHPrBP hat bei Betrachtung der eigenen Ergebnisse (Tab. 17) recht deutliche Effekte auf das Explantatverhalten. Neben der bereits diskutierten Mineralisationshemmung erweist sich die Verbindung bis 2 mmol/l als relativ untoxisch. Sowohl Protein- und Hydroxyprolingehalt als auch das Wachstum und der Uronsäuregehalt sind praktisch bis 2 mmol/l unbeeinflußt. Gleichzeitig nimmt jedoch der DNA-Gehalt dosisabhängig zu und liegt bei 2 mmol/l um 30 % über dem der Kontrollen. Erstaunlicherweise erhöht sich der DNA-Gehalt bei 5 mmol/l nochmal um weitere 5 % während alle übrigen Parameter, vor allem das Wachstum, auf eine erhebliche Beeinträchtigung der Zellfunktion hinweisen. Felix et al. (1983) und Shinoda et al. (1983)fanden eine deutliche Zytotoxizität des AHPrBP an Zellkulturen und zwar bereits ab Konzentrationen von 0,25 mmol/l. Hierzu sollen zwei Überlegungen angeführt werden: Erstens handelt es sich beim vorliegenden Versuchsobjekt um relativ weit entwickelte, kompakte Knochenanlagen, deren Zellen in die Matrixsubstanzen eingebettet sind und nur auf dem Diffusionswege von den im Medium gelösten Pharmaka erreicht werden können. Hieraus leitet sich eine geringere Empfindlichkeit des Organs gegenüber Fremdstoffen des Mediums ab. Zweitens ist zu beobachten, daß ab etwa 0,2 mmol/l Calciumpräzipitate enstehen und nicht nur zur Verarmung an Calcium im Nährmedium führen, sondern auch den

Kontakt des Prüfstoffes mit den Knochenzellen verhindern. Somit ergeben sich ganz andere Aspekte der Dosiswirkungsbeziehung als dies im mikromolaren Bereich anderer Untersuchungen der Fall ist. Um solche Überlegungen zu stützen, sollten Messungen der Bisphosphonatkonzentration im Medium oder sogar in den Explantaten dienlich sein. Die Erhöhung des DNA-Gehaltes der Explantate ist jedoch offensichtlich ein Substanzeffekt, der ja im übrigen auch beim HEBP auftrat (s. 5.4.3.1.), und nicht eine Folge des Calciumentzugs aus dem Medium. Dies konnte durch die Ergebnisse mit verschiedenen Calciumkonzentrationen belegt werden.(s. 4.6.) An dieser Stelle sei auf den unter Kontrollbedingungen eintretenden DNA-Verlust von etwa 20 % hingewiesen. Das AHPrBP verhindert diese Entwicklung und kehrt sogar den Verlust in einen geringen Zellzuwachs um. Reitsma et al. (1983) berichten von Langzeitversuchen an Ratten, bei denen die endostale Knochenresorption verhindert wird. Dadurch kann es nicht zur Ausbildung der Markhöhle und zum Umbau des primären Knochengewebes in reiferes, spongiöses Gewebe kommen. Schließlich führt dies sogar zur extramedullären Hämatopoese bei den Versuchstieren. Hinzu kommt die Beobachtung von persistierenden Chondrozyten im oberen Teil der Metaphysen. Vergleichbare Ergebnisse publizieren Evans et al. (1982) mit HEBP.
Bei der Diskussion des HEBP (s. 5.4.3.1.) ist die Hemmung dieser Umbauvorgänge als Ursache für den Anstieg des DNA-Gehaltes bereits erwähnt worden. Doch sollten ebenfalls hierzu histologische Arbeiten dazu beitragen, diese Interpretationsmöglichkeit abzuklären.

5.4.3.3. Propyliden-2,2-bisphosphonat (PrBP)

In der Literatur konnten nur einige wenige Arbeiten über das PrBP gefunden werden. Die Substanz wurde auf Anregung von Münzenberg und Menge im Pharmazeutischen Institut der Universität München von Reimann synthetisiert. Die Arbeitsgruppe um Münzenberg und Menge publizierte auch die einzigen, auffindbaren Ergebnisse mit

diesem Derivat. Die deutlichen Unterschiede der biologischen Wirkung und teils auch der physikochemischen Eigenschaften der einzelnen Bisphosphonate veranlaßten die Autoren das bislang unbekannte Derivat zu untersuchen.

An der chemischen Struktur des PrBP ist vor allem von Interesse, daß an das Zentral-C-Atom nur zwei Methylgruppen gebunden sind, und das Derivat keine weiteren funktionellen Gruppen neben den Phosphonsäureresten besitzt. Damit unterscheidet es sich wesentlich von den beiden anderen Bisphosphonaten, die in den eigenen Versuchen bearbeitet wurden. Weiterhin sind die beiden Phosphonsäuregruppen am C_2-Atom gebunden, womit ein zusätzlicher Unterschied zum AHPrBP besteht. Im Vorangegangenen wurde bereits erwähnt, daß trotz eingehender Untersuchungen an einer Reihe von Bisphosphonaten keine wesentlichen Strukturwirkungsbeziehungen zu erkennen sind (Shinoda et al. 1983). Offenbar geht die physikalisch-chemische Affinität zum Apatit mit steigender Länge der zentralen Kohlenstoffkette, und damit zunehmender Lipophilie zurück. Doch ist in diesem Zusammenhang die starke Hemmung der Apatitkristallisation durch das Pentylidenbisphosphonat erstaunlich. Mit erhöhter Lipophilie nimmt auch die Toxizität der Bisphosphonate zu. Die eigenen Messungen der Calciumkomplexbildung ergeben eine recht schwache Affinität des PrBP zum Calcium. Nach Münzenberg (persönliche Mitteilung 1984) hat schließlich das Methylenbisphosphonat gar keinen Hemmeffekt auf die Kristallbildung mehr.

Eine zusätzliche Hydroxylgruppe kann offensichtlich als weitere Koordinationsstelle für das Calcium fungieren. Daher wird hierdurch die Affinität zum Calcium erhöht (Claessens und van der Linden 1984, Shinoda et al. 1979). In ähnlicher Weise kann hierzu auch die Aminogruppe des AHPrBP beitragen. (s.5.4.3.2.)

Wie aus Abb. 19 hervorgeht, reduziert das PrBP die Konzentration des ionisierten Calcium verglichen mit den beiden anderen Bisphosphonaten deutlich schwächer. Um so erstaunlicher ist die ausgeprägte Hemmung des Calciumeinbaus in die Explantate. Während die Calciumkomplexierung und die Mineralisationshemmung beim AHPrBP und beim HEBP sehr hohe Korrelationskoeffizienten erge-

ben, ist der Zusammenhang beim PrBP weniger deutlich. Daraus ergibt sich, daß an der Hemmung des Calciumeinbaus neben den physikochemischen weitere Wirkungen der Substanz auf die Tibiae beteiligt sind.

Die Arbeiten von Menge (1980) und Fahnenstich (1985) deuten auf einen primär zellulären Angriff des PrBP hin. Die zitierten Untersuchungen wurden am heranwachsenden Kaninchen durchgeführt. Menge beschreibt eine mit zunehmender Dosis stark gehemmte Knochenentwicklung. Diese äußert sich zunächst in einer Verschmälerung der Epiphysenfuge und einer gestörten Ausbildung der primären Spongiosa. Weiter kommt es zum Persistieren des Blasenknorpels, sowie zu einer verminderten Zelldifferenzierung. Die mechanische Belastbarkeit der Knochen ist vermindert und es kommt zur Deformierung der Röhrenknochen.

Aus den eigenen Versuchen ist im Hinblick auf die Ergebnisse von Menge das Verhalten des DNA- und Uronsäuregehaltes der Explantate interessant. Trotz einer deutlichen Wachstumshemmung und Beeinträchtigung der Protein- und Kollagensynthese bleibt der Uronsäuregehalt der Explantate nahezu unverändert. Dies deutet auf eine ungeminderte Glykosaminoglykansynthese der Chondrozyten hin. Der DNA-Gehalt wird anfangs (bis 1 mmol/l) reduziert, nimmt aber dann mit Erhöhung der Konzentration auf 5 mmol/l wieder leicht zu. Nach den Befunden von Menge könnte dieser Verlauf dahingehend interpretiert werden, daß es zunächst durch Hemmung der Osteoblasten zum DNA-Abfall kommt im weiteren Verlauf aber das Persistieren der Chondrozyten im Blasenknorpel ein Fortschreiten des Zellverlustes verhindert.

Die Versuche von Fahnenstich beschäftigten sich vorwiegend mit Einflüssen auf den Kollagenstoffwechsel durch das Bisphosphonat. Er berichtet über eine dosisabhängige Hemmung der Kollagensynthese nach s.c. Applikation von PrBP am Kaninchen. Dies dokumentiert sich im histologischen Bild der Knochen wie im erniedrigtem Serumhydroxyprolin. Die histochemischen Befunde zeigten eine Vermehrung der GAG, die der Autor auf einen verminderten Abbau zurückführt. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Kollagensynthesehemmung durch PrBP, allerdings soll darauf hingewiesen

werden, daß bei niedrigen Konzentrationen noch kein verminderter Hydroxyprolingehalt gefunden wurde, aber die Mineralisation bereits hoch signifikant beeinträchtigt war. Somit kann der eingeschränkte Calciumeinbau in die Tibiae keine Folge der gehemmten Matrixsynthese sein.

Zusammenfassend vergleicht Menge PrBP mit HEBP und kommt zu der Feststellung, daß das Propanderivat eine Reduzierung der Zellmasse, der Zelldifferenzierung, der Matrixsynthese und der Mineralisation verursacht. Im Gegensatz hierzu bedingt HEBP eher eine gesteigerte Matrixsynthese und kann auf diese Weise in Verbindung mit der Mineralisationshemmung zur Osteomalazie führen. Er leitet hieraus eine mögliche Anwendung des PrBP bei hyperplastischen Osteopathien ab.

Die eigenen Ergebnisse bestätigen die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Bisphosphonate. Vor allem die unter HEBP und AHPrBP beobachtete Zunahme des DNA-Gehaltes tritt unter PrBP-Einfluß nicht auf. Im Gegenteil liegt vermutlich eine selektive Toxizität gegnüber den Osteoblasten vor. Die toxische Wirkung der Bisphosphonate mit unsubstituierten Alkylgruppen führen Shinoda et al.(1983) auf die Kombination von lipophiler Seitenkette und hydrophiler, ionisierter Phosphonsäuregruppe zurück. Sie vergleichen diesen Molekülaufbau mit der Struktur der bakteriziden Detergentien, die durch Schädigung der Membranen Mikroorganismen abtöten können. Die Selektivität des Effektes auf das Knochengewebe beruht auf der Affinität zum mineralisierten Gewebe. In Übereinstimmung hiermit findet Menge bei den behandelten Versuchstieren keine Veränderungen in Leber-, Niere- und Muskelgewebe.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten Pharmakaeinflüsse auf die Mineralisation und weitere mesenchymale Stoffwechselfunktionen untersucht werden. Als Versuchsobjekt dienten fetale Mäusetibiae, die am 19. Tag der Tragzeit exzidiert und für sechs Tage in einem flüssigen Nährmedium kultiviert wurden.
Nach Inkubationsende wurden als Kenngrößen für das Wachstums- und Vermehrungsverhallten der Explantate deren Flächenzuwachs mit einem photographisch-planimetrischen Verfahren und deren DNA- und Proteingehalt biochemisch analytisch bestimmt. Der Hydroxyprolin- und Uronsäuregehalt dienten als Kenngrößen für die Kollagen- bzw. Glykosaminoglykansynthese. Schließlich konnten durch Bestimmung des Calciumgehaltes Einflüsse auf die Mineralisation verfolgt werden.
Zur Durchführung der biochemischen Analysen wurde als methodische Ergänzung bislang bereits angewandter Doppelbestimmungen von DNA und Uronsäure bzw. Protein und Hydroxyprolin eine Vierfachbestimmung aus einem Explantat ausgearbeitet. Des weiteren wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem der Calciumgehalt vergleichsweise kleiner Mengen biologischen Materials nach deren Veraschung bestimmt werden konnte. Dieses titrimetrische Verfahren wurde ebenfalls zur Erfassung der Gesamtcalciumkonzentration des Mediums benutzt und durch Messungen des ionisierten Calciums mit Hilfe einer ionensensitiven Elektrode ergänzt.

Wie sich in Vorversuchen zeigte, mußte zunächst die bei früheren Untersuchungen angewendete Versuchsanordnung modifiziert werden, um eine Calcifizierung der Tibiae in vitro zu ermöglichen. Um über Explantate mit größerer Calciummenge, wie mit hinreichend herangereiftem Knochengewebe verfügen zu können, wurde der Präparationstag der Organe möglichst weit zum Ende der Tragzeit hin verschoben. Durch einen Zusatz von Natrium-ß-glycerophosphat zum Nährmedium konnte eine Calciumeinlagerung während der Inkubation erreicht werden, ohne daß dabei andere Paramter beeinflußt wurden.

Die Untersuchungen des Explantatverhaltens unter Kontrollbedingungen, wie auch die Befunde über die Entwicklung der Knochenanlagen in vivo ließen die charakteristischen Merkmale eines sich entwickelnden Knochengewebes erkennen. Neben generellem Wachstum standen mesenchymspezifische Syntheseleistungen, insbesondere eine ausgeprägte Kollagen- und Glykosaminoglykansynthese und die Calcifizierung im Vordergrund.

Unter Einwirkung des Natriumfluorids kam es zur vermehrten Calciumeinlagerung in die Explantate. Die Synthese der übrigen Matrixbestandteile blieb hierbei unbeeinflußt. Erst bei der höchsten Konzentration (2,0 mmol/l) zeigte die Substanz deutlich toxische Eigenschaften, die fast zur vollständigen Hemmung des Wachstums und aller Syntheseprozesse führten. Vergleichbar mit den Symptomen bei der endemischen Fluorose kam es bei dieser Konzentration zur massiven Calciumeinlagerung in das Gewebe.

Die Mellitsäure führte zu einer starken Hemmung der Mineralisation. Als Ursache für diesen Effekt scheint die komplexe Bindung der Calciumionen des Kulturmediums verantwortlich zu sein. Hierfür sprechen die Messungen des Ionisationsgrades des Calciums und die gute Korrelation des Calciumgehaltes der Explantate mit der Konzentration an freiem Calcium im Medium. Bei mittleren Konzentrationen (5 - 10 mmol/l) förderte die Mellitsäure das Wachstum der knorpeligen Epiphysen und die Synthese der Glykosaminoglykane. Die erwähnten Effekte traten bei Konzentrationen auf, die noch keine Hemmwirkungen auf die übrigen Parameter erkennen ließen.

Die untersuchten Bisphosphonate (1-Hydroxyethyliden-1,1-bisphosphonat (HEBP), 3-Amino-1-hydroxypropyliden-1,1-bisphosphonat (AHPrBP), Propyliden-2,2-bisphosphonat (PrBP)) hemmten die Mineralisation der Explantate. Beim HEBP und AHPrBP konnte diese Wirkung wie bei der Mellitsäure auf eine Komplexierung des Calciums zurückgeführt werden. Das PrBP bedingte eine wesentlich schwächere Komplexierung des Calciums, hemmte aber trotzdem den

Mineraleinbau beträchtlich. Vor allem in der niedrigsten Konzentration (0,2 mmol/l) war das PrBP diesbezüglich den beiden anderen Bisphosphonaten überlegen.
Der DNA- Gehalt der Explantate war unter Einwirkung des HEBP und AHPrBP erhöht. Eine mögliche Erklärung dieser Wirkung ist die Hemmung der Umbauvorgänge bei der Entwicklung des Knochengewebes aus der Knorpelvorstufe. Diese Überlegungen basieren vorwiegend auf dem Befund, daß unter Kontrollbedingungen ein leichter Rückgang des DNA-Gehaltes beobachtet wird. Die biochemischen Ergebnisse alleine berechtigen jedoch nicht zu einer weitergehenden Interpretation dieses interessanten Effektes. Durch Versuche mit modifizierten Calciumkonzentrationen konnte aber ausgeschlossen werden, daß es sich bei den beschriebenen Effekten um Sekundärwirkungen eines Calciummangels handelt. Im Gegensatz zu den erwähnten Bisphosphonatwirkungen veränderte eine verminderte Calciumkonzentration den DNA- Gehalt der Tibiae nicht, während es zur vermehrten Bildung von Kollagen und Glykosaminoglykanen kam. Das PrBP bewirkte keinen Anstieg des DNA-Gehaltes und ließ Effekte auf andere Explantatfunktionen bereits bei geringeren Konzentrationen als die anderen Bisphosphonate erkennen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Ali, S.Y.: Analysis of matrix vesicles and their role in the calcification of epiphyseal cartilage. Fed. Proc. 35, 135-142 (1976)

Bachra, B.N.: Calcification of connective tissue. Int. Rev. connect. Tissue Res. 5, 165-208 (1970)

Baxter, L.A.
Bednar, G.J.
Canty, D.J.
DeLuca, H.F.
Flora, L.
Ginn, D.L.
Hassing, G.S.
Stern, L.: Effect of Ethane-1-hydroxy-1.1-diphosphonate and vitamin D on bone mineralization. Calcif. Tissue int. 28, 73-78 (1979)

Bickel, A.: Über den Einfluß der Mellitsäure auf die Lebens- und Vermehrunsfähigkeit sowie einige biosynthetische Funktionen in vitro gezüchteter Zellen. Diss. Med. Fak. Univ. Bonn (1984)

Bijoevet, O.L.M.: Die Verwendung von EHDP (Ethylen-1-Hydroxy-1.1-Diphosphonat) zur Verhinderung von Verknöcherungen im Zusammenhang mit der totalen Hüftendoprothese. In: Ziegler, R. (Hrsg.) EHDP Ein neues therapeutisches Prinzip bei Osteopathien und Calciumstoffwechselstörungen. 161-172 München-Wien-Baltimore Urban & Schwarzenberg 1982

Binderman, I.
Fein, N.
Harell, A.
Somjen, D.: Modulation of DNA synthesis in bone cell cultures by extracellular calcium levels. Calcif. Tissue int. 35, A27 (1983)

Blumenthal, L.C.
Posner, A.S.
Rosenberg, L.C.
Silverman, L.D.: Effect of proteoglycans on in vitro hydroxyapatite formation. Calcif. Tissue int. 27,75-82 (1979)

Boonekamp, P.M.
Bijvoet, O.L.M.: Differential effects of bisphosphonates on formation and function of bone resorbing capacity of osteoclast-like cells from a hematopoietic system. Calcif. Tissue int. 35, A30 (116) (1983)

Boonekamp, P.M.
Bijvoet, O.L.M.: How do bisphosphonates act on peripheral mononuclear blood cells? Calcif. Tissue int. 35, A30 (117) (1983)

Breuer, N.A.: Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Antirheumatika auf den Glykosaminoglykanstoffwechsel in vitro gezüchteter embryonaler Tibiaanlagen. Diss. Math.-Nat.-Fak. Univ. Bonn (1979)

Buddecke, E.: In: Buddecke, E. (Hrsg.) Grundriss der Biochemie. 86 Berlin-New York Walter De Gryter 1977

Buxbaum, J.N. Kammerman, S.: Immunoglobin abnormalities in Paget's disease of bone. Clin. exp. Immunol. 55, 200-204 (1984)

Caplan, A.I. Osdoby, P. Syftestad, G.: The development of embryonic bone and cartilage in tissue culture. Clin. Orthop. 174, 243-263 (1983)

Ceriotti, G.: A microchemical determination of desoxyribonucleic acid. J. biol. Chem. 198, 297 (1952)

Chambers, T.J.: The cellular basis of bone resorption. Clin. Orthop. 151, 283-293 (1980)

Claessens, R.A.M.J. van der Linden, J.G.M.: Stability constants of tin(II) and calcium diphosphonate complexes. J. inorg. Biochem. 21, 73-8(1984)

Dambacher, M.A.: In: Dambacher, M.A. (Hrsg.) Praktische Osteologie. Stuttgart-New York Georg Thieme Verlag 1982

Dische, Z.: A new specific color reaction of hexuronic acids. J. biol. Chem. 167, 189-198 (1947)

Ecarot-Charrier, B. Glorieux, F.H. Pereira, G. van der Rest, M.: Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. J. Cell. Biol. 96, 639-643 (1983)

Endo, H.: Ossification in tissue culture Histological development of the femur of chick embryo in various liquid media. Exp. Cell. Res. 21, 151-163 (1960)

Esser, N.: Untersuchungen über den Einfluß potentiell bindegewebsaktiver Pharmaka auf das Wachstum, den Protein- und Hydroxyprolingehalt in vitro inkubierter fetaler Tibiaanlagen. Diss. Math.-Nat. Fak. Univ. Bonn 1983

Evans, R.A. Dunstan, C.R. Hills, E. Howlett, C.R.: The effect of long-term low-dose diphosphonate treatment on rat bone. Clin. Orthop. 30, 290-299 (1982)

Fahnenstich, H.: Der Einfluß von Propan-2.2-diphosphonat auf die Matrixsynthese des Osteoblasten. Diss. Med. Fak. Univ. Bonn 1985

Felix, R.
Bonjour, J.-P.
Fleisch, H.
Schenk, R.: Effect of aminohydroxyalkylidenebisphosphonates (AHAlBP) on calvaria cells in culture and on bone resorption and mineralization in vivo. Calcif. Tissue int. 35, A22 (85) (1983)

Fleckenstein, A.: Calcium antagonism in heart and smooth muscle - Experimental facts and therapeutics prospeccts. Monograph John Wiley and sons New York 1983

Fleisch, H.: Diphosphonates: History and mechanismus of action. Metab. Bone Dis. relat. Res. 4&5, 279-288 (1981)

Fleisch, H.: Mechanisms of normal mineralization in bone and cartilage. In:Nancollas, G.H. (Hrsg.) Biological mineralization and demineralization. 233-241 Berlin-Heidelberg-New York Springer Verlag 1982

Fleisch, H.
Bisaz, S.: Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. Am. J. Physiol. 203, 671-675 (1962)

Fleisch, H.
Neumann, W.F.: Mechanisms of calcification: role of collagen, polyphosphates and phosphatase. Am. J. Physiol. 200, 1296-1300 (1961)

Francis, M.D.
Briner, W.W.
Oertel, R.P.
Slough, C.L.: An in vitro and in vivo investigation of mellitate and ethane-1-hydroxy-1.1-diphosphonate in calcium phosphate systems. Calc. Tiss. Res. 23, 53-60 (1977)

Frey, K.-D.: Untersuchungen antirheumatisch wirksamer Pharmaka am Modell von Kulturen embryonaler Tibia-Explantate. Diss. Math.-Nat. Fak. Univ. Bonn 1975

Frijlink, W.B.
Bijvoet, O.L.
Heynen, G.
Te Velde, J.: Treatment of Paget's disease with (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1.1-bisphosphonate (A.P.D.) Lancet 14, 799-803 (1979)

Garside, J.: Nucleation. In: Nancollas, G.H. (Hrsg.) Biological mineralization and demineralization. 23-35 Berlin-Heidelberg-New York Springer Verlag 1982

Gössi, M.: Effects of fluoride on the degree of mineralization of the bone tissue of male and female mice. In: Courvoisier, B., Baud, C.A., Donath,A. (Hrsg.) Fluoride and Bone. 62-63 Bern-Stuttgart-Vienna Hans Huber Publishers 1978

Grabenstetter, R.J.
Cilley, W.A.: Polynuclear complex formation in solutions of calcium ion and ethane-1-hydroxy-1.1-diphosphonic acid. I. complexometrie and pH titrations. J. phys. Chem. 75, 676-682 (1971)

Gregory, J.D.: The effect of borate on the carbazole reaction. Arch. Biochem. Biophys. 89, 157-159 (1960)

Gundberg, C.M.
Gallop, P.M.
Lian, J.B.
Steinberg, J.J.: Urinary gamma-carboxyglutamic acid and serum osteocalcin as bone markers: studies in osteoporosis and paget's disease. J. clin. Endocrinol. Metab. 57, 1221-1225 (1983)

Harakas, N.K.: Demineralized bone-matrix-induced osteogenesis. Clin. Orthop. 188, 239-251 (1984)

Hascall, V.C.
Lowther, D.A.: Components of the organic matix: proteoglycans. In:Nancollas, G.H. (Hrsg.) Biological mineralization and de-

mineralization. 179-198 Berlin-Heidelberg-New York Springer Verlag 1982

Hauschka, P.V. Reid, M.L.: Vitamin K dependence of a calcium-binding protein containing gamma-carboxyglutamic acid in chicken bone. J. biol. Chem. 253, 9063-9068 (1978)

Hauschka, P.V. Gallop, P.M.: Purification and calcium-binding properties of osteocalcin, the gamma-carboxyglutamate-containing protein of bone. In Calcium binding proteins and calcium function North Holland, New York, 338-347 (1977)

Herold, G.: Zur Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes in Fleischwaren nach Stegemann. Die Fleischwirtschaft 50, 837 (1970)

Hinrichs, U.: Einfluß einiger Antirheumatika auf mesenchymale Stoffwechselprozesse embryonaler Tibiakulturen unter besonderer Berücksichtigung des Kollagenstoffwechsels. Diss. Math.-Nat. Fak. Univ.Bonn 1979

Hinrichs, U. Karzel, K.: Untersuchungen über den Kollagenstoffwechsel in vitro gezüchteter fetaler Knochenanlagen. Arzneim. Forsch./Drug Res. 33 (I), 143 (1983)

Holland, R.I.: Fluoride inhibition of DNA synthesis in isolated nuclei from cultured cells
Acta Pharmacol. Toxicol. 45, 302-305 (1979)

Johnston Jr., C.C.: EHDP bei der Behandlung der Osteodystrophia deformans Paget. In: Ziegler, R. (Hrsg.) EHDP Ein neues therapeutisches Prinzip bei Osteopathien und Calciumstoffwechselstörungen.91-102 München-Wien-Baltimore Urban & Schwarzenberg 1982

Jung, S.: Grundlagen für die Zucht und Haltung der wichtigsten Versuchstiere; S. 251, Fischer Verlag, Stuttgart (1962)

Karzel, K.
Frey, K.-D.
Lee, K.J.
Lippert, U.: Kulturen fetaler Knochenanlagen als Arbeitsmodell zur Untersuchung von Pharmakaeinflüssen auf mesenchymale Stoffwechselprozesse.
Arzneim. Forsch./Drug Res. 29(II), 1823 (1979)

Keck, E.
Krüskemper, H.L.
Schärtl, A.
West, T.B.: Influence of hPTH(1-34), hCT and prostaglandins on in vitro metabolism of human trabecular bone.
Calcif. Tissue int. 35, 644 (1983)

Kramsch, D.M.
Aspen, A.J.
Rozler, L.J.:
Atherosclerosis: Prevention by agents not affecting abnormal levels of blood lipids.
Science 213, 1511-1512 (1981)

Kröschel, P.:
Zur Wirkung von Pharmaka auf den Glykosaminoglykan-Stoffwechsel und das Wachstum in vitro kultivierter fetaler Knochenanlagen.
Diss. Math.-Nat. Fak. Univ.Bonn 1983

Leach, S.A.:
An investigation of the effects of mellitic acid on hydroxyapatite.
J. Biol. Buccale 6, 55-63 (1978)

Lee, K.-J.:
Kulturen embryonaler Knochenanlagen in vitro als Arbeitsmodell zum Studium von Pharmakaeinflüssen auf Bindegewebsfunktionen.
Diss. Math.-Nat. Fak. Univ. Bonn 1972

Leonhardt, H.:
In: Leonhardt, H. (Hrsg.) Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. 92
Stuttgart Georg Thieme Verlag 1974

Lerner, U.
Larsson, A.:
The bisphosphonate HEBP and AHPrBP but not AHBP inhibit mineral mobilization and lysosomal enzyme release from mouse calvaria bones in tissue culture. Experientia 40, 965-967 (1984)

Liu, C.-C.
Evacko, M.L.
Ivey, J.L.
Howard, G.A.:
Effects of ß-glycerophosphate on bone resorption in vivo and in vitro.
Calcif. Tissue int. 35, 645 (1983)

Liu, C.-C.
Baylink, D.J.
Differential response in alveolar bone at two different bone sites
Calcif. Tissue int. 36, 182 (1984)

Lorenzo, J.A.
Holtrop, M.E.
Raisz, L.G.:
Effects of phosphate on calcium release, lysosomal enzyme activity in the medium, and osteoclast morphometry in cultured fetal rat bones.
Metab. Bone Dis. relat. Res. 5, 187-190 (1984)

Lossnitzer, K.
Bräuer, H.
Pfennigsdorf, G.:
In: Knoll AG, Ludwigshafen (Hrsg.) Myokard Gefäße Calcium. Synopsis in Bildern zum Wirkprinzip des Calcium-Antagonismus. 78-84 Mainz Erasmusdruck GmbH 1983

Lowell, J.D.
Bowerman, J.W.
Finerman, G.A.
Gold, R.H.
Krengel, W.F.
Murray, W.R.
Volz, R.G.:
Die Bedeutung des Diphosphonats EHDP bei der Prophylaxe heterotoper Ossifikation nach totalem Hüftgelenkersatz.
In: Ziegler, R. (Hrsg.) EHDP Ein neues therapeutisches Prinzip bei Osteopathien und Calciumstoffwechselstörungen. 173-195 München-Wien-Baltimore Urban & Schwarzenberg 1982

Lowry, O.H.
Farr, L.A.
Protein measurement with the folin phenol reagent.

Randall, R.J.
Rosebrough, N.J.:
J. biol. Chem. 160, 265 (1951)

Marvaso, V.
Bernard, G.W.:
Initial intramembraneous osteogenesis in vitro.
Am. J. Anat. 149, 453-468 (1977)

Mellberg, J.R.
Mallon, D.E.:
Acceleration of remineralization in vitro by sodium monofluorophosphate and sodium fluoride.
J. dent. Res. 63(9), 1130-1135(1984)

Menge, M.:
Wirkungen von Propan-2.2-bisphosphonat auf die Calciumphosphatbildung in vitro, und die Knochengewebsbildung in der primären Spongiosa in vivo.
Hab.-Schr. Med. Fak. Univ. Bonn 1981

Minkin, C.
Jennings, J.M.:
Carbonic anhydrase and bone remodeling: Sulfonamide inhibition of bone resorption in organ culture.
Science 176, 1031-1033 (1972)

Münzenberg, K.J.:
Persönliche Mitteilung (1985)

Palmoski, M
Brandt, K.:
Effects of diphosphonates on glycosaminoglycan synthesis and proteoglycan aggregation in normal adult articular cartilage.
Arthritis Rheum. 21, 942-949 (1978)

Petrovic, A.
Stutzmann, J.:
Effects of sodium fluoride, cholecalciferol and calcium gluconate on human normal and

otospongiotic bone.
In: Courvoisier, B., Donath, A. and Baud, C.A. (Hrsg.)
Fluoride and bone. 201-211
Bern-Stuttgart-Vienna Hans Huber Publishers 1978

Posner, A.S.: The chemistry of bone mineral.
Bull. Hosp. Joint Dis. 39, 126-144 (1978)

Preston, C.J.
Beneton, M.
Duckworth, T.
Kanis, J.A.
Russel, R.G.G.
Series, J.J.
Smith, T.W.D.
Yates, A.J.P.: Does intravenous EHDP dissociate bone formation from bone resorption.
Calcif. Tissue int. 35, A63 243 (1983)

Preston, C.J.
Kanis, J.A.
Russel, R.G.G.
Yates, A.J.P.: Effective short term treatment regimes with oral EHDP in paget' s disease.
Calcif. Tissue int. 35, A63 244 (1983)

Ramp, W.K.
Neuman, W.F.: Some factors affecting mineralization of bone in tissue culture.
Am. J. Physiol. 220, 270-274 (1971)

Rath, N.C.
Anbar, M.
Dimitrijevich, S.: Effect of polyvinyl phosphonates and ethane hydroxydiphosphonate on mineralization of ectopic bone.
Chem. biol. Interact. 48, 339-347 (1984)

Ream, L.J.: The effects of short-term fluoride ingestion on bone formation and resorption in the rat femur. Cell Tissue Res. 221, 421-430 (1981)

Rebel, A.
Basle, M.
Filmon, R.
Kouyoumdjian, S.
Lepatezour, A.
Pouplard, A.: Viral antigens in osteoclasts from Paget's disease of bone. Lancet II, 344-346 (1980)

Reitsma, P.H.
Bijvoet, O.L.M.
van der Wee-Pals, L.J.A.
Verlinden-Ooms, H.: Kinetic studies of bone and mineral metabolism during treatment with (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1.1-bisphosphonate (APD) in rats. Calcif. Tissue int. 32, 145-157 (1980)

Reynolds, J.J.: Cellular and biochemical events in bone resorption. Royal Society of Medicine international Congress and Symposium Serie 55, London 43-50 (1983)

Reynolds, J.J.: Skeletal tissue in culture. In: Bourne, G.H. (Hrsg.) The biochemistry and physiology of bone 69-126 New York-London Academic Press 1972

Richterlich, R.: Gesamt-Eiweiß: Methode von Folin-Ciocalteu. In: Richterlich, R. (Hrsg.) Klinische Chemie, 2. Aufl. 243

Rodan, G.A.
Martin, T.J.:
Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - a hypothesis. Calcif. Tissue int. 33, 349-351 (1981)

Schamschula, R.G.
Barmes, D.E.:
Fluoride and health: Dental caries, osteoporosis, and cardiovascular disease.
Ann. Rev. Nutr. 1, 427-435 (1981)

Schelling, S.H.
Tashjian, A.H.
Wolfe, H.J.:
Role of the osteoclasts in prostaglandin E -stimulated bone resorption
A correlative morphometric and biochemical analysis.
Lab. Invest. 42, 290-295 (1980)

Scherft, J.P.
Moskalewski, S.:
The amount of proteoglycans in cartilage matrix and the onset of mineralization.
Metab. Bone Dis. relat. Res. 5, 195-203 (1984)

Schnakenburg v., K.
Groß-Selbeck, G.
Wiedemann, H.R.:
EHDP bei Fibrodysplasia ossificans progressiva congenita.
In: Ziegler, R.(Hrsg.) EHDP Ein neues therapeutisches Prinzip bei Osteopathien und Calciumstoffwechselstörungen.
221-228
München-Wien-Baltimore
Urban & Schwarzenberg 1982

Schulz, A.
Delling, G.:
Pathologie des Morbus Paget - Auswirkungen der Behandlung.
In: Ziegler, R.(Hrsg.) EHDP

Ein neues therapeutisches Prinzip bei Osteopathien und Calciumstoffwechselstörungen. 31-45 München-Wien-Baltimore Urban & Schwarzenberg 1982

Shepard, T.H.: In: Shepard, T.H. (Hrsg.) Catalog of teratonic agents. 3rd Edition Baltimore The Johns Hopkins University Press 1980

Shinoda, H.
Adamek, G.
Felix, R.
Fleisch, H.
Hagan, P.
Schenk, R.: Structure-activity relationship of various bisphosphonates. Calcif. Tissue int. 35, 87-99 (1983)

Severson, A.R.: Differentiation of mononuclear cells into multinucleated osteoclast-like cells. Exp. Cell Biol. 51, 267-274 (1983)

Shinoda, H.
Felix, R.
Fleisch, H.: Structure-activity relationship of diphosphonates with alkyl groups of various length. Mineral and Electrolyte Metabolism 2, 268-269 (1979)

Shakhmatova, E.I.
Kabachnik, M.I.
Medved, T.Ya.
Natochin, Yu. V.: Ability of diphosphonates to bind calcium and their effect on osmotic permeability of the frog bladder wall. Bull. exp. Biol. Med. 93, 780-783 (1982)

Siris, E.S.
Canfield, R.E.
Jacobs, T.P.
Spector, P.J.
Stoddart, K.E.:
Clinical and biochemical effects of EHDP in Paget's disease of bone: Patterns of response to initial treatment and to long-term therapy.
Metab. Bone Dis. relat. Res. 4&5, 301-308 (1981)

Siris, E.S.
Baquiran, D.C.
Canfield, R.E.
Jacobs, T.P.:
Long-Term therapy of Paget's disease of bone with EHDP.
Arthritis Rheum. 23, 1177-1184 (1980)

Smith, M.L.
Boyce, B.F.
Boyle, I.T.
Fogelman, I.
Ralston, S.:
Correlation of skeletal uptake of 99mTc-diphosphonate and alkaline phosphatase before and after oral diphosphonate therapy in Paget 's disease.
Metab. Bone Dis. relat. Res. 5, 167-170 (1984)

Stegemann, H.:
Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin-T und p-Dimethylaminobenzaldehyd.
Z. physiol. Chem. 311, 41 (1958)

Suzuki, F.
Shimomura, Y.
Takase, T.
Takigawa, M.
Uchida, A.:
Simulation of the initial stage of endochondral ossification: In vitro sequential culture of growth cartilage cells and bone marrow cells.
Proc. natl. Acad. Sci. USA 78, 2368-2372 (1981)

Tenenbaum, H.C.
Heersche, J.N.M.:
Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone in

vitro.
Calcif. Tissue int. 34, 76-79 (1983)

Tenenbaum, H.C.: Role of organic phosphate in mineralization of bone in vitro. J. dent. Res. 60, 1586-1589 (1981)

Thews, G.
Mutschler, E.
Vaupel, P.: In: Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P. (Hrsg.) Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen. 38 Stuttgart Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH 1980

Toshiyuki, Y.
Mundy, G.: Regulation of osteoclasts activating factor (OAF) production by prostaglandin (PG) is mediated by cyclic-AMP. Calcif. Tissue int. 28, 152 (1979)

Urist, M.R.
Nakagawa, M.
Nakata, N.
Nogami, H.: Experimental myositis ossificans. Arch. Pathol. Lab. Med. 102, 312 (1978)

Varughese, K.
Moreno, E.C.: Crystal growth of calcium apatites in dilute solutions containing fluoride. Calcif. Tissue int. 33, 431-439 (1981)

Voegel, J.C.
Frank, M.R.: Adsorption of benzenecarboxylic acids onto hydroxyapatite and human enamel powder. J. Colloid Interface Science 83, 26-34 (1981)

Weiker, H.: In: Siegenthaler, W. (Hrsg.) Klinische Pathologie S.9 Stuttgart Georg Thieme Verlag 1976

Weischer, C.H. Frey, K.-D. Karzel, K.: Vergleichende Untersuchungen zum histologischen und histochemischen Bild in vitro kultivierter und frisch excidierter fetaler Mäuse-Tibia. Arzneimittelforsch. 30, 251-254 (1980)

Wergedal, J.E. Baylimk, D.J. Farley, J.R.: Direct effect of fluoride on proliferation and alkaline phosphatase on human bone cells. Calcif. Tissue int. 35, 652 (1983)

Wiedmer, W.H. Fleisch, H. Trechsel, U. Zbinden, A.M.: Ultrafiltrability and Chromatographic properties of pyrophosphate, 1-hydroxyethylidene-1.1-bisphosphonate, and dichloromethylenebisphosphonate in aqueous buffers and in human plasma. Calcif. Tissue int. 35, 397-400 (1983)

Wong, K.M. Klein, L.: Effects of varying doses of 3 diphosphonates (EHDP, Cl2MDP & APD) on bone resorption and formation in rats prelabelled with 3H-tetracycline. Calcif. Tissue int. 35, 653 (1983)

Yates, A.J.P.
Beard, D.J.
Cameron, E.C.
Douglas, D.L.
Kanis, J.A.
Paterson, A.D.
Preston, C.J.
Russel, R.G.G.
Woodhead, S.:

Contrasting effects of two diphosphonates in the medical treatment of primary hyperparathyroidism.
Calcif. Tissue int. 35, A64 245 (1983)

Zahntke, C.:

Die Wirkung von Mellitsäure auf die Calcifikation von kollagenem Rattenschwanzsehnengewebe in vitro.
Diss. Med. Fak. Univ. Bonn 1985

Herrn Prof.Dr. K. Karzel möchte ich besonders danken für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Laborplatzes in seiner Abteilung. Darüber hinaus möchte ich mich bei ihm für die stete Hilfsbereitschaft und lehrreiche Zusammenarbeit, sowie die Möglichkeit als wissenschaftlicher Angestellter am Institut zu arbeiten bedanken.

Herrn Prof.Dr.E. Roeder danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Bei allen Angehörigen des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, insbesondere Frau U. von der Bey, Frau D. Stehmann und Frau I. Köster möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Hervorheben möchte ich hierbei Frau I. Konrad, die durch ihre stets zuverlässige Mitarbeit bei der Präparation, den biochemischen Bestimmungen, sowie bei der Erstellung des Manuskriptes wesentlich zum Enstehen der Arbeit beigetragen hat.

Herrn M. Lippoldt gilt mein Dank für die akurate Anfertigung der graphischen bzw. photographischen Darstellungen, sowie die mühevolle Arbeit bei der photographisch-planimetrischen Erfassung des Explantatwachstums.

Herrn A. Lenzen und besonders Herrn L. Fenger möchte ich für die zuverlässige und sachkundige Betreuung der Mäusezucht danken.

Dem Werkstattmeister des Institutes Herrn W. Ortmann danke ich für die ideenreiche und fachmännische Hilfe bei der Entwicklung, Anfertigung und Wartung technischer Apparaturen.

Lebenslauf

14.5.58	In Hürth- Knapsack geboren
4/65 - 6/68	Kath. Volksschule Knapsack
9/68 - 6/71	Städt. St. Michael Gymnasium Bad Münstereifel
9/71 - 6/77	Erzb. St.Angela Gymnasium Bad Münstereifel
13.6.77	Allgemeine Hochschulreife
10/77 - 3/78	Studium der Dipl.- Chemie Univ. Münster
4/78 - 9/81	Studium der Pharmazie Univ. Bonn
10/81 - 3/82	Pharmaziepraktikum Veybach- Apotheke Euskirchen
4/82 - 9/82	Pharmaziepraktikum Fa. Bayer AG Leverkusen
12.10.82	Abschluß der Pharmazeutischen Prüfung
22.11.82	Approbation als Apotheker
seit 11/82	Doktorand bei Prof. Dr. K. Karzel
1/83 - 3/83	Wissenschaftliche Hilfskraft am Inst. f. Pharmakologie u. Toxikologie Univ. Bonn
seit 4/83	Wissenschaftlicher Angestellter am gleichen Institut